

Generierung genetisch modifizierter Hühnermodelle für die immunologische Forschung

von

Dorothea Elisabeth Aumann

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Generierung genetisch modifizierter Hühnermodelle
für die immunologische Forschung**

von

Dorothea Elisabeth Aumann

aus Roding

München, 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Angefertigt am Wissenschaftszentrum Weihenstephan,
Professur für Biotechnologie der Reproduktion, TU München
Mentor: Prof. Dr. Benjamin Schusser

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 29.07.2017

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 T-Zellen bei Säugern und Vögeln	3
2.1.1 $\gamma\delta$ T-Zellen bei Mensch und Maus	4
2.1.1.1 Genetische Organisation der $\gamma\delta$ TZR-Gene bei Mensch und Maus	4
2.1.1.2 Eigenschaften und Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen bei Mensch und Maus	5
2.1.2 $\gamma\delta$ T-Zellen beim Huhn	10
2.1.2.1 Genetische Organisation der $\gamma\delta$ TZR-Gene beim Huhn	10
2.1.2.2 Eigenschaften und Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen beim Huhn	12
2.2 Technologien zur Generierung genetisch veränderter Hühner	13
2.2.1 Generierung genetisch veränderter Hühner durch Verwendung retroviraler Vektoren	14
2.2.2 Generierung genetisch veränderter Hühner durch DNA Mikroinjektion	15
2.2.3 Generierung genetisch veränderter Hühner unter Verwendung primordialer Keimzellen	16
2.2.3.1 Primordiale Keimzellen: Isolierung, Kultur, Transfektion und Transplantation	16
2.2.3.2 Effiziente Transfektion von PGCs	18
2.2.3.3 Gezielte Genmodifikationen in PGCs mittels homologer Rekombination	20
2.2.3.4 Gezielte Genmodifikationen in PGCs mittels sequenzspezifischer Nukleasen	22
3. ZIELSETZUNG	30
4. MATERIAL UND METHODEN	31
4.1 Tiere und Tierhaltung	31
4.1.1 Hühner	31
4.1.2 Bruteier	31
4.2 Zellkultur	32
4.2.1 Medien und Zusätze	32
4.2.2 Gewinnung von PGCs aus Blut	33
4.2.3 Gewinnung von PGCs aus Germinal Crescent	34
4.2.4 Gewinnung von PGCs aus Gonaden	35
4.2.5 Einfrieren von Zellen	36
4.2.6 Auftauen von Zellen	36
4.2.7 Kultivierung von Zellen	37
4.2.7.1 Kultivierung von PGCs	37
4.2.7.2 Kultivierung von DT40 Zellen	37
4.3 Elektroporation von Zellen	37
4.3.1.1 Elektroporation von PGCs	38
4.3.1.2 Elektroporation von DT40 Zellen	38

4.3.1.3	Selektion von transfizierten Zellen	39
4.4	Gewinnung von Hahnen-Sperma.....	40
4.5	Isolation genomischer DNA.....	41
4.5.1	Isolation genomischer DNA aus kultivierten Zellen.....	41
4.5.1.1	Isolation mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit	41
4.5.1.2	Isolation mit der NaOH-Extraktionsmethode	42
4.5.2	Isolation genomischer DNA aus 6-7 Tage alten Hühnerembryonen	42
4.5.3	Isolation genomischer DNA aus Hühnerblut	43
4.5.4	Isolation genomischer DNA aus Hahnen-Sperma	44
4.6	Polymerase Kettenreaktion	44
4.6.1	PCR unter Verwendung des 5x FIREPol Master Mix	45
4.6.2	PCR unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	46
4.6.3	PCR unter Verwendung der LongAmp Taq DNA Polymerase	49
4.7	Agarose-Gelelektrophorese	50
4.8	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen	51
4.9	Verdau von Plasmiden durch Restriktionsenzyme	52
4.9.1.1	Linearisierung von Cγ KO 1 und Cγ KO 2	53
4.10	Vektoren und Klonierung.....	54
4.10.1	Verwendete Konstrukte.....	54
4.10.2	Gibson Assembly	56
4.10.3	Klonierung von CRISPR/Cas9-Konstrukten.....	59
4.10.4	Amplifikation des TZR Cγ-Gens und Klonierung mit dem TOPO® TA Cloning Kit®	62
4.11	Transformation von Bakterien.....	64
4.12	Aufreinigung von Plasmid-DNA	65
4.12.1	Aufkonzentrierung von DNA.....	66
4.13	T7 Endonuklease Assay	66
4.14	Durchflusszytometrische Untersuchungen	68
4.15	Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop.....	68
4.16	Untersuchung von Embryonen und Küken auf die Expression fluoreszierender Proteine.....	68
4.17	Generierung von Keimbahn-Chimären	69
4.17.1	Injektion von PGCs in H&H Stadium 14-16 Embryonen.....	70
4.17.2	Transfer in Ersatz-Eischalen	71
5.	ERGEBNISSE	73
5.1	Gewinnung von PGC Linien	73
5.2	Generierung von transgenen Hühnern mit ubiquitärer mCherry Expression	75
5.2.1	Klonierung eines mCherry-attB Konstrukts.....	76
5.2.2	Erstellung mCherry-positiver CB PGCs	76
5.2.3	Generierung von Keimbahn-Chimären mit CB PGC mCherry Linien	77

5.2.3.1	Test der mCherry CB PGC Keimbahn-Chimären auf Keimbahn-Transmission	79
5.2.4	Erstellung mCherry-positiver LSL PGCs	81
5.2.5	Generierung von Keimbahn-Chimären mit LSL PGC mCherry Linien	81
5.2.6	Test der mCherry LSL PGC Keimbahn-Chimären auf Keimbahn-Transmission	82
5.3	Knock-out des TZR Cγ-Gens	84
5.3.1	Sequenzierung des TZR C γ -Gens der CB Hühnerlinie	84
5.3.2	Klonierung eines Targeting Vektors für homologe Rekombination zur Deletion des C γ -Gens	85
5.3.3	Homologe Rekombination in CB PGCs	86
5.4	Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in Hühnerzellen	87
5.4.1	Targeting von eGFP in DT40 Zellen	87
5.4.2	Targeting von eGFP in PGCs	93
5.4.3	Etablierung von sgRNA-Sequenzen für das C γ -Gen	96
5.4.3.1	Testtransfektionen in DT40 Zellen und T7 Endonuklease Assay	97
5.4.3.2	Testtransfektionen in DT40 Zellen und Deletion des C γ -Gens	98
5.4.3.3	Test eines Vektors zur gleichzeitigen Expression zweier sgRNAs	100
5.5	CRISPR/Cas9-System und homologe Rekombination in CB PGCs	101
5.5.1	Kombination von CRISPR/Cas9-System und C γ KO 1 in CB PGCs	101
5.5.2	Klonierung eines Targeting Vektors für <i>homology directed repair</i> mit 1000 bp Homologie-Armen	103
5.5.3	Kombination von CRISPR/Cas9-System und C γ KO 2 in CB PGCs	104
5.6	CRISPR/Cas9-System und homologe Rekombination in LSL PGCs	106
5.6.1	Kombination von CRISPR/Cas9-System und C γ KO 1 in LSL PGCs	106
5.6.2	Kombination von CRISPR/Cas9 und C γ KO 2 in LSL PGCs	107
5.7	Generierung von transgenen Hühnern mit einem Knock-out des Cγ-Gens ...	108
5.7.1	Generierung von Keimbahn-Chimären mit CB PGC C γ KO 3F6	108
5.7.1.1	Test der CB PGC C γ KO 3F6 Keimbahn-Chimären auf Keimbahn-Transmission	109
5.7.2	Generierung von Keimbahn-Chimären mit LSL PGC C γ KO Linien	110
5.7.2.1	Test der LSL PGC C γ KO Keimbahn-Chimären auf Keimbahn-Transmission	112
6.	DISKUSSION	117
6.1	Gewinnung von PGC Linien mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund	117
6.2	Generierung genetisch modifizierter Hühner mit ubiquitärer mCherry Expression	120
6.3	Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in Hühnerzellen	125
6.4	Knock-Out des TZR Cγ-Gens in PGCs	128
6.4.1	Knock-out des TZR C γ -Gens mittels homologer Rekombination	128

6.4.2	Targeting des C γ -Gens mittels des CRISPR/Cas9-Systems	129
6.5	Generierung genetisch modifizierter Hühner mit einem Knock-out des Cγ-Gens	134
6.6	Generierung genetisch veränderter Hühnerlinien – Ausblick	136
7.	ZUSAMMENFASSUNG	139
8.	SUMMARY	141
9.	LITERATURVERZEICHNIS.....	143
10.	ANHANG.....	157
11.	DANKSAGUNG.....	161

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Organisation der TZR α , TZR δ - und TZR γ - Gene bei der Maus	5
Abbildung 2: Übersicht über verschiedene Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen	10
Abbildung 3: Organisation der TZR (T cell-receptor, TCR) α , TZR δ - und TZR γ -Gene beim Huhn.....	11
Abbildung 4: Migration der PGCs während der Entwicklung des Hühnerembryos.....	16
Abbildung 5: Generierung transgener Hühner unter Verwendung transfizierter primordialer Keimzellen	18
Abbildung 6: Schema der homologen Rekombination	21
Abbildung 7: Möglichkeiten der Reparatur eines Nuklease-induzierten Doppelstrangbruchs	23
Abbildung 8: Schema des CRISPR Lokus von <i>S. pyogenes</i>	25
Abbildung 9: Spermagewinnung beim Hahn.....	41
Abbildung 10: Injektion von PGCs in H&H Stadium 14-16 LSL Embryonen	71
Abbildung 11: Transfer und Bebrütung von Hühnerembryonen in Puteneischaalen	72
Abbildung 12: Schlupf der Küken aus Ersatz-Eischaalen in individuellen Boxen	72
Abbildung 13: PCR zur Geschlechtsbestimmung von PGC Linien	74
Abbildung 14: Schema des mCherry-attB Konstrukts.....	76
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse von PGCs auf mCherry Expression	77
Abbildung 16: Kolonisation von Gonaden mit CB PGC mCherry 1B2	78
Abbildung 17: PCR zum Nachweis von Keimbahn-Transmission der Keimbahn-Chimäre CB PGC mCherry 1B2 R011	80
Abbildung 18: Kolonisation von Gonaden mit LSL PGC mCherry 10	82
Abbildung 19: Erfolgreiche Keimbahn-Transmission von LSL PGC mCherry 11 Chimäre R149	83
Abbildung 20: Schema des C γ KO 1 Targeting Vektors	86
Abbildung 21: Schema des C γ TZR Wildtyp Lokus, des Targeting Vektors und des C γ TZR KO Lokus nach homologer Rekombination.....	86
Abbildung 22: PCR Analyse von genomischer DNA klonal expandierter CB PGCs transfiziert mit C γ KO 1	87
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven DT40 Zellen 5 Tage nach Transfektion mit 5, 10 oder 15 μ g PX330-sgRNA 1408	89
Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven DT40 Zellen nach Transfektion mit 10 μ g PX459-sgRNA 1408	91

Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven DT40 Zellen nach Transfektion mit 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408	92
Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven DT40 Zellen, untransfiziert oder nach Transfektion mit 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408	93
Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven PGCs nach Transfektion mit 10 oder 15 µg PX330-sgRNA 1408	94
Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven PGCs nach Transfektion mit PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408.....	95
Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven PGCs nach Transfektion mit PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 und Selektion mit 400 µg/ml Hygromycin	96
Abbildung 30: Schema des C γ -Gens sowie der Positionen (Pos.) der sgRNA-Sequenzen und der durch Cas9 eingefügten Doppelstrangbrüche.	97
Abbildung 31: T7 Endonuklease Assay für PX330-sgRNA 1409 und PX330-sgRNA 1410.....	98
Abbildung 32: Grafik des C γ Lokus vor und nach Deletion durch CRISPR/Cas9-System	99
Abbildung 33: PCR zum Nachweis der Deletion des C γ -Gens	100
Abbildung 34: PCR zum Nachweis der Deletion des C γ -Gens in DT40 Zellen nach Transfektion mit PX333-sgRNAs 1403 und 1410.....	101
Abbildung 35: Schema des C γ Wildtyp Lokus und der Reparatur mit C γ KO 1 als <i>repair template</i> nach durch CRISPR/Cas9-System induzierten Doppelstrangbruch.....	102
Abbildung 36: PCR Analyse zum Nachweis der korrekten Integration des C γ KO 1 Targeting Vektors	103
Abbildung 37: Schema von C γ KO 2.....	103
Abbildung 38: Schema des C γ Wildtyp Lokus und der Reparatur mit C γ KO 2 als <i>repair template</i> nach durch CRISPR/Cas9-System induzierten Doppelstrangbruch.....	104
Abbildung 39: PCR zum Nachweis der korrekten Integration der Markerkassette nach Transfektion von C γ KO 2 in CB PGCs	105
Abbildung 40: PCR zum Nachweis der korrekten Integration der Markerkassette nach Transfektion von C γ KO 1 in LSL PGCs	107

Abbildung 41: PCR zum Nachweis der korrekten Integration der Markerkassette nach Transfektion von C γ KO 2 in LSL PGCs	108
Abbildung 42: PCR zum Nachweis transgener Anteile im Sperma von CB PGC C γ KO Chimären.....	110
Abbildung 43: Kolonisation von Gonaden mit LSL PGC C γ KO	112
Abbildung 44: Erfolgreiche Keimbahn-Transmission von LSL PGC 2-7 C γ KO C2 Chimäre R101	115
Abbildung 45: PCR-Nachweis der korrekten Integration der Markerkassette in den C γ Lokus bei eGFP-positiver Nachzucht von LSL PGC 2-7 C γ KO C2 Chimäre R149	116

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über die zur Selektion verwendeten Antibiotika	40
Tabelle 2: Primer für PCR-Reaktionen mit dem 5x FIREPol Master Mix	45
Tabelle 3: Reaktionsbedingungen für die 5x FIREPol Master Mix PCR	46
Tabelle 4: Primer für PCR-Reaktionen mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ..	48
Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase PCR...	48
Tabelle 6: Primer für PCR-Reaktionen mit der LongAmp Taq DNA Polymerase	49
Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für die LongAmp Taq DNA Polymerase PCR	50
Tabelle 8: Verwendete Vektoren	54
Tabelle 9: Verwendete Konstrukte	55
Tabelle 10: Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Gibson Assembly	58
Tabelle 11: Verwendete sgRNA-Sequenzen	60
Tabelle 12: Verwendete chemisch kompetente Bakterien	64
Tabelle 13: Übersicht über die erstellten PGC Linien	75
Tabelle 14: Übersicht über die Injektionen von mCherry CB PGC Linien in LSL-classic Embryonen	78
Tabelle 15: Keimbahn-Transmissionsraten von mCherry CB PGC Keimbahn-Chimären ..	80
Tabelle 16: Übersicht über die Injektionen von mCherry LSL PGC Linien in LSL-classic Embryonen	81
Tabelle 17: Keimbahn-Transmissionsraten von mCherry LSL PGC Keimbahn-Chimären ..	83
Tabelle 18: Geschlüpfte Küken von LSL PGC mCherry Chimären mit nachgewiesener Keimbahn-Transmission	84
Tabelle 19: Durchgeführte Transfektionen zum Test von CRISPR/Cas9-Konstrukten in DT40 Zellen	99
Tabelle 20: Durchgeführte Transfektionen in DT40 Zellen zum Test von PX333	100
Tabelle 21: Kotransfektionen von C γ KO 1 und CRISPR/Cas9-Konstrukten in CB PGCs	102
Tabelle 22: Kotransfektionen von C γ KO 2 und CRISPR/Cas9-Konstrukten in CB PGCs	105
Tabelle 23: Übersicht über die Injektionen von CB PGC C γ KO 3F6 in LSL-classic Embryonen	109
Tabelle 24: Keimbahn-Transmissionsraten von CB PGC C γ KO 3F6 Keimbahn-Chimäre R170	110
Tabelle 25: Übersicht über die Injektionen von LSL PGC C γ KO Linien in LSL-classic Embryonen	111

Tabelle 26: Keimbahn-Transmissionsraten von LSL PGC C γ KO Keimbahn-Chimären..	114
Tabelle 27: Geschlüpfte Küken von LSL PGC C γ KO Chimären mit nachgewiesener Keimbahn-Transmission	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°	Grad
°C	Grad Celsius
ALV	Aviäres Leukosevirus
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
att-Rekombinationsstelle	<i>attachment site</i>
bp	Basenpaare
BP	Bandpaßfilter
BSA	bovines Serum Albumin
C	<i>Constant</i> -Segment
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cas	CRISPR <i>associated</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeat</i>
crRNA	CRISPR RNA
D	<i>Diversity</i> -Segment
DMSO	Dimethylsulfoxid, (CH ₃) ₂ SO
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sort</i>
FasL	Fas Ligand
FBS	fötales Rinderserum, <i>fetal bovine serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FT	Farbteiler
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

h	Stunde
H&H	Hamburger und Hamilton
HCl	Chlorwasserstoff
HDR	<i>homology directed repair</i>
HR	Homologie-Region
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
IU	<i>international units</i>
J	<i>Joining</i> -Segment
kb	<i>Kilo Base</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LP	Langpaßfilter
LSL	Lohmann selected Leghorn
M	Molar
MgCl	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NHEJ	<i>non homologous end joining</i>
OV	Ovalbumin
OVM	Ovomucoid
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGC	Primordiale Keimzelle, <i>primordial germ cell</i>

Pos.	Position
RAG	<i>recombination activating gene</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein, <i>red fluorescent protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
sec	Sekunde
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
STM	Sucrose-Tris-Magnesiumchlorid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TALEN	<i>Transcription Activator Like Effector Nuclease</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	<i>T-cell-receptor</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
TEN	Tris-EDTA-NaCl
tracrRNA	trans-aktivierende crRNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	<i>Variable</i> -Segment
V	Volt
ZFN	<i>Zink Finger Nuclease</i>
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1. EINLEITUNG

Neben seiner großen und weiter zunehmenden Bedeutung als lebensmittellieferndes Tier hat das Huhn in der Vergangenheit auch als Modelltier in der Wissenschaft eine wichtige Rolle gespielt. So sind einige wichtige immunologische Kenntnisse, wie beispielsweise die Beschreibung der Antikörper produzierenden B-Lymphozyten der Forschung am Huhn zu verdanken. Neben zahlreichen Gemeinsamkeiten weist das Immunsystem von Säugern und Vögeln auch einige Unterschiede auf. Bei Säugern und Vögeln wird das Immunsystem in das angeborene (unspezifische) sowie das adaptive (spezifische) Immunsystem eingeteilt. B-Zellen und T-Zellen sind die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Die von den B-Zellen produzierten Antikörper sind essentiell für die Abwehrreaktion gegen extrazelluläre Antigene und bilden den humoralen Teil der spezifischen Immunität. Die T-Zellen lassen sich anhand ihres T-Zell-Rezeptors weiter in $\alpha\beta$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen unterteilen. Die Funktionen von $\alpha\beta$ T-Zellen als Effektorzellen der zellvermittelten Immunität, die an MHC-Moleküle gebundene Antigene erkennen und somit zur Abwehr intrazellulärer Pathogene beitragen, sind bereits gut erforscht. $\gamma\delta$ T-Zellen scheinen von $\alpha\beta$ T-Zellen verschiedene Aufgaben zu erfüllen, die jedoch noch wenig genau charakterisiert sind. Während bei Mensch und Maus der Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut gering ist, nehmen sie bei einigen landwirtschaftlichen Nutztieren wie Rindern, Schafen, Schweinen und Hühnern einen bedeutenden Anteil ein.

Viele wissenschaftliche Erkenntnisse werden durch reverse Genetik, vor allem am Mausmodell, gewonnen. Die Deletion von Genen und somit deren Funktion führten zu einem besseren Verständnis von deren Bedeutung und Aufgaben im Organismus. Da gentechnische Methoden durch die besondere Reproduktionsphysiologie der Vögel bei Hühnern lange Zeit deutlich schwieriger oder nicht anwendbar waren, fand dieser methodische Ansatz beim Huhn bisher kaum Anwendung. Dies führte zu einer Einschränkung der Nutzbarkeit des Huhns als wissenschaftliches Modelltier. Erst in den letzten Jahren konnten auf Grund der Etablierung von Methoden zur Kultivierung und Modifikation primordialer Keimzellen Knock-out Hühnerlinien generiert werden, die nun unter anderem als Modellorganismen in der immunologischen Forschung genutzt werden. Durch die Erstellung einer B-Zell defizienten Hühnerlinie mit Knock-out des Immunglobulin schwere Ketten-Gens konnten wertvolle Erkenntnisse über die Entwicklung von B-Zellen beim Huhn gewonnen werden. In einem ähnlichen Ansatz sollten in dieser Arbeit $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Hühner generiert werden. Von dem Einsatz dieser Hühnerlinie in der immunologischen Forschung können genauere

Erkenntnisse über die Funktion der $\gamma\delta$ T-Zell-Population in der Immunregulation und der Infektionsabwehr beim Huhn, aber auch bei anderen $\gamma\delta$ T-Zell reichen Spezies erwartet werden.

Zur Erstellung einer $\gamma\delta$ T-Zell defizienten Hühnerlinie sollte auch der Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems in primordialen Keimzellen getestet werden. Das CRISPR/Cas9-System ist ein in Bakterien und Archaeen vorkommendes adaptives Immunsystem, welches zum Einsatz in der Molekularbiologie adaptiert wurde und die Gentechnik revolutioniert. Die Methode erlaubt das schnelle und kostengünstige Einfügen sequenzspezifischer Veränderungen ins Genom zahlreicher Organismen.

In dieser Arbeit sollen primordiale Keimzellen genutzt werden, um genetisch modifizierte Hühnerlinien für den anschließenden Einsatz in der immunologischen Forschung zu erstellen. Des Weiteren soll durch die Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in primordialen Keimzellen die zukünftige spezifische Modifikation des Hühnergenoms vereinfacht werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 T-ZELLEN BEI SÄUGERN UND VÖGELN

Im Immunsystem von Wirbeltieren finden sich zwei verschiedene T-Zell-Populationen, die $\alpha\beta$ T-Zellen und die $\gamma\delta$ T-Zellen. Unterscheiden lassen sich die T-Zell-Populationen anhand ihres T-Zell-Rezeptors (TZR): der heterodimere TZR der $\alpha\beta$ T-Zellen besteht aus einer α - und einer β -Kette, während $\gamma\delta$ T-Zellen auf ihrer Oberfläche einen heterodimeren TZR aus einer γ - und einer δ -Kette exprimieren [1]. Die Rezeptoren der T-Zellen entstehen durch *recombination-activating gene* (RAG)-medierte V-(D)-J-C Rekombination aus mehreren Gensegmenten [2]. Während die Effektorfunktionen der $\alpha\beta$ T-Zellen gut charakterisiert sind, sind die biologischen Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen noch weitestgehend ungeklärt. Beim Menschen und der Maus ist der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen mit 1-5 % der Lymphozyten im peripheren Blut relativ gering [3], dagegen kann er bei einigen $\gamma\delta$ T-Zell *high* Haustierarten wie Rindern [4, 5], Schweinen [6] und Hühnern [7] allerdings 20-50 % ausmachen. Neben den TZRs dienen auch die Korezeptor-Moleküle CD4 und CD8 zur Einteilung der T-Zellen in Subpopulationen.

Die Entwicklung der T-Zellen im Thymus gestaltet sich bei Säugern und Vögeln sehr ähnlich [8]. Hämatopoetische Vorläuferzellen wandern während der Embryogenese in Wellen in den Thymus ein, beim Huhn gibt es drei Wellen an den Embryonaltagen 6, 12 und 18 [9]. Aus diesen Vorläuferzellen, genannt Thymozyten, jeder Welle differenzieren sich zuerst $\gamma\delta$ T-Zellen, wenig später entstehen aus ihnen auch $\alpha\beta$ T-Zellen [9]. In der selben Reihenfolge verlassen die T-Zellen ebenfalls in Wellen den Thymus, um in die Peripherie auszuwandern [10, 11]. Zunächst exprimieren die Thymozyten weder CD4 noch CD8 und werden als doppelt-negative Thymozyten bezeichnet. Der größte Anteil der $\gamma\delta$ T-Zell-Vorläufer im Thymus bleibt CD4⁻ und CD8⁻ [7, 12], erst in der Peripherie exprimieren die meisten $\gamma\delta$ T-Zellen dann das CD8-Molekül [8]. Auch die Vorläufer der $\alpha\beta$ T-Zellen exprimieren zunächst weder CD4 noch CD8 [12-14]. Während dieses doppelt-negativen Stadiums kommt es zum Rearrangement der TZR-Gene, Zellen mit funktionalem TZR werden selektiert [12-14]. Auf das doppelt-negative Entwicklungsstadium folgt ein Stadium von doppelt-positiven CD4⁺ und CD8⁺ Thymozyten, die einen Prä- $\alpha\beta$ TZR exprimieren. Diese Zellen teilen sich und differenzieren weiter zu kleineren doppelt-positiven Zellen mit reifem $\alpha\beta$ TZR [12-14]. Nach positiver Selektion von doppelt CD4⁺ und CD8⁺ positiven $\alpha\beta$ TZR Vorläuferzellen, die in angemessener Intensität mit dem *major histocompatibility complex* (MHC) I Molekülen interagieren, entstehen einfach

positive CD8⁺ αβ T-Zellen, bei Fähigkeit zur Interaktion mit MHC II Moleküle einfach positive CD4⁺ αβ T-Zellen [12-14].

2.1.1 γδ T-Zellen bei Mensch und Maus

2.1.1.1 Genetische Organisation der γδ TZR-Gene bei Mensch und Maus

Die Entdeckung der γδ T-Zellen beim Menschen begann 1985 mit der Beschreibung einer neuen Genfamilie, der sogenannten γ-Gene, durch Hayday et al. [15]. Bezüglich ihrer Sequenz und Organisation weisen diese γ-Gene große Ähnlichkeiten zu den αβ T-Zell-Rezeptor-Genen sowie zu den Immunglobulin-Genen auf [15]. In T-Zellen rearrangieren die γ-Gene zu einer funktionalen Transkriptionseinheit. Transkriptionsprodukte der γ-Gene werden ausschließlich in T-Zellen exprimiert, welche den αβ TZR nicht exprimieren [15, 16]. Wenig später konnte von Brenner et al. gezeigt werden, dass das durch die γ-Gene kodierte Protein Teil eines TZRs ist, der vom αβ TZR verschieden ist [17]. Dieser TZR ist ebenfalls heterodimer, wobei das mit der γ-Kette paarende bis dahin unbekannte Protein als δ-Kette bezeichnet wurde [17]. 1987 folgte die Entdeckung der für die δ-Kette kodierenden δ-Gene [18-20].

Bereits im Jahr 1988 stand fest, dass anhand der T-Zell-Rezeptoren zwischen zwei verschiedenen T-Zell-Linien unterschieden werden kann. Der heterodimere TZR besteht bei der ersten Linie aus einer α- und einer β- Kette, bei der zweiten Linie aus einer γ- und einer δ-Kette [16]. Die Ketten entstehen während der Entwicklung der Lymphozyten durch Rearrangement von *variable* (V), *joining* (J) und *constant* (C) Gensegmenten. Die γ-Kette wird aus den γ-Genen rearrangiert. Für das Rearrangement der β- und δ- Kette stehen zusätzlich noch *diversity* (D) Gene zur Verfügung [21]. Die Organisation der TZR γ- und α/δ- Loci bei Mensch und Maus wurde untersucht, ein Schema für die genetische Organisation bei der Maus ist in Abbildung 1 zu sehen. Auffällig ist eine enge genetische Verbindung zwischen den αβ T-Zellen und den γδ T-Zellen. So ist bei Maus und Mensch der TZRδ Locus in den TZRα Locus eingebettet, einige V-Segmente können sogar für die TZR α- und die TZR δ-Kette verwendet werden [22]. Im Genom des Menschen finden sich 14 Vγ-Gensegmente, von denen acht aktiv sind, fünf Jγ-Gensegmente und zwei Cγ-Gensegmente [23]. Bei Mäusen lassen sich sieben Vγ-Gensegmente, vier Jγ-Gensegmente und vier Cγ-Gensegmente unterscheiden, die in vier VJC Clustern organisiert sind. Rearrangement findet nahezu ausschließlich innerhalb dieser Cluster statt, was die Diversität stark einschränkt [24, 25]. Der TZRδ Locus besteht beim Mensch aus

fünf V δ -, drei D δ -, vier J δ - und einem C δ -Gensegment [21], bei der Maus aus sechs (fünf funktionalen) V δ -, zwei D δ -, zwei J δ - und einem C δ -Gensegment [26, 27].

Es gibt somit ein großes genetisches Potential für die Diversität des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptors, welches jedoch nicht ausgenutzt wird. Nur wenige Varianten werden nachgewiesen und zahlreiche $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen sind im Wesentlichen oligoklonal [28, 29]. Die Diversität wird durch intrazelluläre Mechanismen auf DNA-Ebene begrenzt und nicht durch extrazelluläre Selektion über den TZR [30].

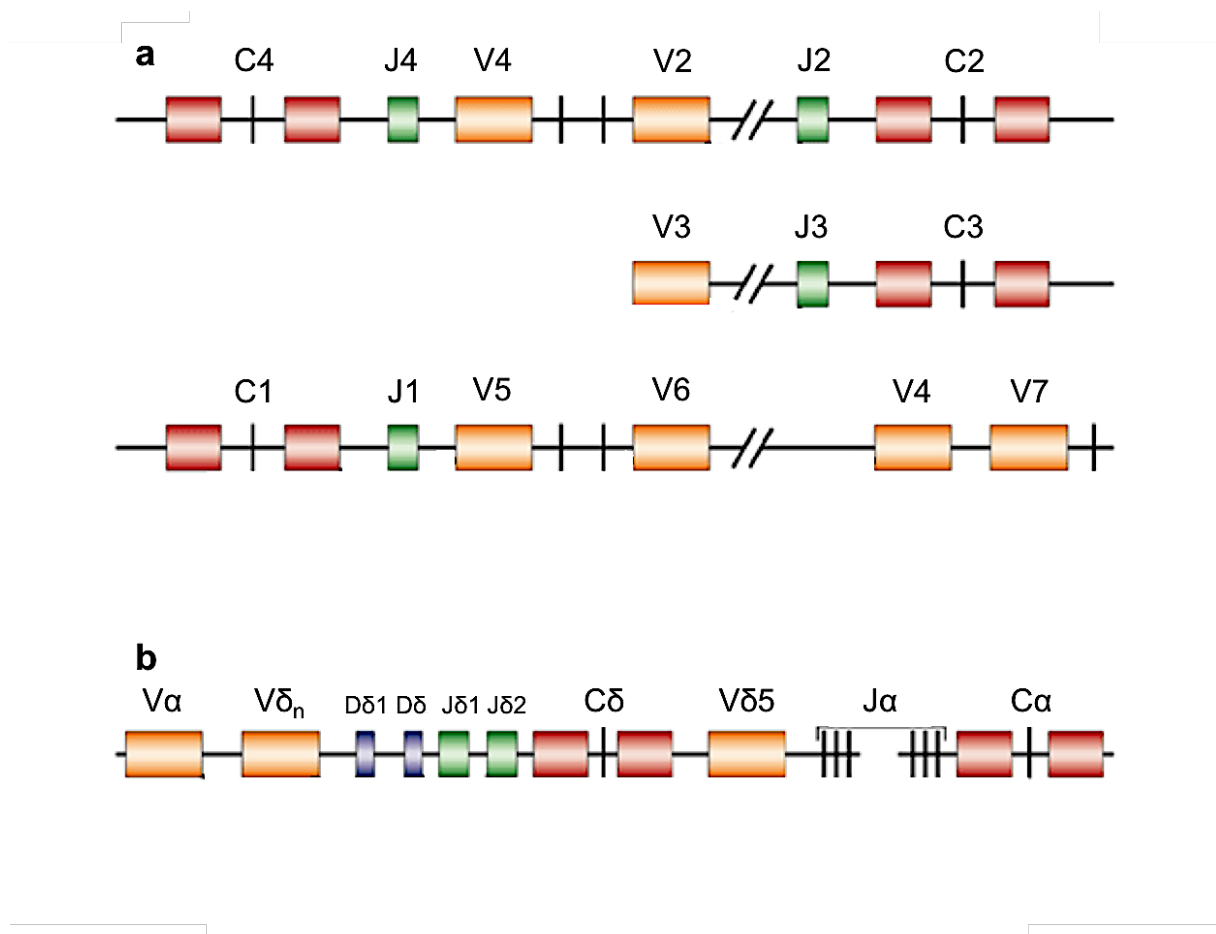


Abbildung 1: Organisation der TZR α , TZR δ - und TZR γ - Gene bei der Maus

Die schwarzen Balken repräsentieren C-Region Exons, farbige Boxen repräsentieren V- und J-Region Exons. a) γ -Gen Locus mit C γ -, J γ - und V γ -Genen, organisiert in vier VJC Clustern. b) Der δ -Gen Locus ist eng mit dem α -Gen Locus verbunden. V δ -, D δ -, J δ -Gene und ein einziges C δ -Gen liegen zwischen den V α - und J α -Gensegmenten. Abbildung modifiziert nach Carding et al. [3].

2.1.1.2 Eigenschaften und Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen bei Mensch und Maus

Während die von aktivierten B-Zellen produzierten Immunglobuline vorwiegend an zirkulierende Antigene binden, sind die Liganden für $\alpha\beta$ T-Zellen zellgebunden [15]. $\alpha\beta$ T-

Zellen sind die Effektorzellen der zellulären, adaptiven Immunität, sie lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: $CD8^+ \alpha\beta$ T-Zellen erkennen endogene, an MHC I Moleküle gebundene Antigene, sie differenzieren sich nach Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen [12]. $CD4^+ \alpha\beta$ T-Zellen erkennen an MHC II Moleküle gebundene, exogene Antigene und entwickeln sich nach Aktivierung zu Helfer T-Zellen, die die Funktion anderer Immunzellen wie beispielsweise B-Zellen unterstützen [12].

Über die Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen dagegen ist deutlich weniger bekannt. Es steht zur Diskussion, dass $\gamma\delta$ T-Zellen keine notwendige Aufgabe erfüllen und daher im Laufe der Zeit verschwinden könnten [22]. Dagegen spricht, dass sich auch beim Neunauge, einem primitiven kieferlosen Vertebraten, drei verschiedene Immunkompartimente mit unterschiedlichen Rezeptoren finden. Zwei dieser RAG-unabhängig entstehenden Rezeptoren sind zellgebunden, einer wird sezerniert [31]. Aus dieser evolutionären Etablierung lässt sich folgern, dass eine dreiteilige Organisation der adaptiven Immunität möglicherweise Vorteile mit sich bringt [22].

Bei Mensch und Maus gibt es vermutlich verschiedene $\gamma\delta$ T-Zell-Subtypen mit unterschiedlichen Funktionen, je nach anatomischer Lokalisation und TZR-Spezifität [3]. Der größte Teil davon entwickelt sich im Thymus. Von dort wandert die Mehrheit direkt in Gewebe wie Dermis, Epidermis, Darm, Lunge oder Uterus. Diese Zellen entstehen sehr früh in der Ontogenese und weisen eine auffallend geringe Rezeptordiversität auf [30]. Ein kleinerer Anteil der Zellen migriert in lymphatische Gewebe und durchläuft dort Priming und klonale Expansion [22]. Das bedeutet, dass die naive T-Zelle nach Bindung eines Antigens an ihren TZR aktiviert wird (Priming), erst anschließend erfolgen klonale Teilungen, die dazu führen dass zahlreiche Zellen mit demselben TZR zur Verfügung stehen, sowie die Differenzierung zu Effektor-T-Zellen [12]. Dies zeigt sich auch in der Verteilung von $\gamma\delta$ T-Zellen im Organismus: Bei den meisten Tieren und beim Menschen sind nur 1-5 % der im Blut zirkulierenden Lymphozyten $\gamma\delta$ T-Zellen, in epithelreichen Geweben wie der Haut, dem Reproduktionstrakt und dem Darm kann dieser Anteil auf bis zu 50 % steigen [3]. Die im Gewebe angesiedelten $\gamma\delta$ T-Zellen, wie die $V\gamma5-V\delta1$ Subpopulation der Haut und die $V\gamma6-V\delta1$ Subpopulation des Uterusepithels von Mäusen, sind oligoklonale Zellpopulationen, die während der Fetalentwicklung in aufeinanderfolgenden Wellen entstehen [28, 29]. Es wird angenommen, dass diese wenig diversen $\gamma\delta$ T-Zellen entweder häufig in diesen Geweben vorkommende Pathogene oder körpereigene Moleküle, die auf eine gestörte Gewebemöostase hinweisen, erkennen [22, 32, 33]. Dadurch kann eine große Zahl $\gamma\delta$ T-Zellen ohne vorherige klonale Expansion aktiviert werden [34, 35]. Dies erlaubt den $\gamma\delta$ T-Zellen an der frühen, afferenten Phase der

Immunantwort teilzunehmen [22, 35]. Somit zeigen $\gamma\delta$ T-Zellen mit ihrer RAG-medierten Rezeptordiversität und der Ausbildung von Gedächtniszellen [36] einerseits ein typisches Merkmal der adaptiven Immunität und mit der Fähigkeit zur schnellen Aktivierung ohne vorherige klonale Expansion andererseits ein Charakteristikum der angeborenen Immunität. Aufgrund dieser Vereinigung von Merkmalen des angeborenen und erworbenen Immunsystems werden $\gamma\delta$ T-Zellen auch *innate-like* Lymphozyten genannt [22].

Die Antigenbindungskapazitäten von $\gamma\delta$ T-Zellen sind bisher nur unzureichend geklärt. Wesentliche Unterschiede zu $\alpha\beta$ T-Zellen konnten aber bereits aufgezeigt werden: $\gamma\delta$ T-Zellen können, anders als $\alpha\beta$ T-Zellen, Antigene erkennen, die nicht an MHC Moleküle gebunden sind. Dazu gehören auch zahlreiche Selbstantigene wie MHC Moleküle und MHC verwandte Proteine [37, 38]. Ein großer Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen scheint zu einer polyklonalen Immunantwort auf körpereigene Stress-Antigene oder häufige vorkommende Pathogen-Moleküle beizutragen [39, 40]. Die im Blut des Menschen vorherrschende V γ 9-V δ 2 Subpopulation kann durch phosphorylierte Metaboliten des Isoprenoid-Stoffwechsels aktiviert werden [41]. Zu diesen gehören Isopentylpyrophosphat, das bei infektiöser und nicht-infektiöser Dysregulation in Zellen akkumuliert, sowie Hydroxymethyl-butyl-pyrophosphat, ein Metabolit des in vielen Mikroorganismen ablaufenden Desoxyxylulose-Phosphat-Stoffwechsels [41, 42]. Die genauen Mechanismen, mit denen $\gamma\delta$ T-Zellen diese Phosphoantigene erkennen können, sind noch nicht bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass es durch die intrazelluläre Ansammlung von Phosphoantigenen zu einer veränderten Organisation von Butyrophilin-3A, einem Molekül aus der Immunglobulin-Superfamilie, auf der Zelloberfläche kommt, was wiederum zur Aktivierung der V γ 9-V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen führt [41, 43].

Um die Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen zu erforschen wurden zahlreiche Studien mit Hilfe von transgenen Mausmodellen durchgeführt. Itohara et al. generierten 1993 eine Mauslinie, bei der das Gen für die C-Region der δ -Kette ausgeschaltet ist [30]. Diese Mutation führt zum vollständigen Verlust von Zellen die den $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor exprimieren. Bei diesen $\gamma\delta$ T-Zell defizienten (TZR $\delta^{-/-}$) Mäusen sind die $\alpha\beta$ T-Zellen in ihrer Entwicklung und Funktion nicht beeinträchtigt [30]. In Infektionsversuchen wurden Ausmaß und Verlauf verschiedener Infektionen bei den TZR $\delta^{-/-}$ Mäusen mit dem bei Kontrollmäusen unterschiedlicher Genotypen verglichen. Diese Versuche erlauben einige Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen:

Roberts et al. untersuchten 1996 die Auswirkung einer Infektion mit *Eimeria vermiformis* auf $\alpha\beta$ T-Zell defiziente Mäuse im Vergleich zu $\gamma\delta$ T-Zell defizienten Mäusen [1]. *Eimeria spp.* sind intrazelluläre Protozoen, die bei zahlreichen Wirbeltierspezies vorkommen und bei Nutztierspezies als Erreger der Kokzidiose auch wirtschaftliche Bedeutung haben [1, 44]. *Eimeria vermiformis* ruft bei Wildtyp Mäusen milde Symptome mit transienter Hyperplasie der Lieberkühn-Krypten und Verkürzung der Darmzotten hervor [1, 45]. Normalerweise treten keine intestinalen Blutungen oder Diarrhoe auf. $\alpha\beta$ T-Zell defiziente Mäuse zeigten nach Infektion deutliche Schwächen in der protektiven Immunantwort [1]. Sie schieden länger und mehr Oozysten aus als Kontrolltiere und die symptomatische Phase dauerte länger an. Anders als bei Kontrolltieren entwickelte sich nach Erstinfektion keine protektive Immunität. $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Mäuse dagegen entwickelten eine normale Immunität und die Ausscheidung der Oozysten unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollen [1]. Allerdings trat deutlicher Blutverlust über den Darm auf. Mikroskopische Untersuchungen zeigten auffällige Hämorrhagien zwischen den Darmzotten, welche bei Kontrolltieren sowie $\alpha\beta$ T-Zell defizienten Mäusen nicht auftraten [1]. Auch wurden Schädigungen der Zotten und Kryptenhyperplasien beobachtet. In der Lamina propria fand sich eine erhöhte Anzahl von Immunzellen. Der Phänotyp bei beiden Genotypen ließ sich durch adoptive Transfers der fehlenden T-Zell-Population aufheben [1]. Fehlten den infizierten Mäusen sowohl $\gamma\delta$ T-Zellen als auch $\alpha\beta$ T-Zellen, so traten die ausgeprägten Blutungen nicht auf. Dies deutet darauf hin, dass diese Symptomatik durch die $\alpha\beta$ T-Zellen ausgelöst wurde [1]. Aus diesen Beobachtungen schlussfolgerten Roberts et al., dass die $\gamma\delta$ T-Zellen eine regulatorische Funktion erfüllen und es in ihrer Abwesenheit zu einer überschießenden Reaktion der $\alpha\beta$ T-Zellen auf die *Eimeria*-Infektion kam [1]. Andere Studien beschreiben ebenfalls eine Hyperaktivität von $\alpha\beta$ T-Zellen in Abwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen [39, 46].

Auch bei der Immunantwort gegen verschiedene Viruserkrankungen sind $\gamma\delta$ T-Zellen von Bedeutung: Zwei Tage nach intraperitonealer Infektion mit Vaccinia Virus zeigten Mäuse eine erhöhte Anzahl Interferon γ (IFN γ) sezernierender $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz. Es konnte keine Virus-Spezifität dieser $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen werden. $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Mäuse zeigten im Vergleich zu diesen Kontrolltieren höhere Virustiter und eine höhere Mortalität. Die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses war bei den $\gamma\delta$ T-Zell defizienten Mäusen unbeeinträchtigt [47]. Anders verhielt es sich bei West Nile Virus Infektionen, hier war bei $\gamma\delta$ T-Zell defizienten Mäusen sowohl die primäre als auch die sekundäre Immunantwort beeinträchtigt [48]. Des Weiteren sind $\gamma\delta$ T-Zellen eine wichtige Quelle für Interleukin 17 bei

verschiedenen bakteriellen Infektionen [49]. Interleukin 17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches unter anderem zur Expansion und Akkumulation von neutrophilen Granulozyten führt [50]. $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit *Nocardia* spp., *Klebsiella* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Mycobacterium* spp. und *Pseudomonas* spp. [49].

Eine Übersicht über das aktuelle Wissen über $\gamma\delta$ T-Zellen bietet das Review „*Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology*“ von Pierre Vantourout und Adrian Hayday (2013) [22]. Darin sind sechs verschiedene wichtige Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen zusammengefasst, die vermutlich von den verschiedenen Subpopulationen in unterschiedlichem Ausmaß wahrgenommen werden. Hierzu gehört die Bildung von Zytokinen und Chemokinen wie IFN γ , Tumore Nekrose Faktor- α , Interleukin 17 und Interleukin 4 [47, 49, 51, 52]. Über die Bildung dieser Zytokine nehmen $\gamma\delta$ T-Zellen an der efferenten Phase der Immunantwort teil. Eine weitere nachgewiesene Funktion ist die Regulierung von B-Zellen über Interleukin 13 [53]. Auch können $\gamma\delta$ T-Zellen die Bildung von germinalen Zentren sowie den Klassenwechsel und die Produktion von IgG und IgE-Antikörpern fördern [54]. Dies konnte in *severe combined immunodeficiency* Mäusen, die weder B-Zellen noch T-Zellen besitzen, nach Transplantation von B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet werden [54]. Über die Produktion von Wachstumsfaktoren wie *Insulin-like growth factor 1* werden Stromazellen reguliert [55, 56], womit $\gamma\delta$ T-Zellen einen Beitrag zur Integrität von Geweben leisten [57]. $\gamma\delta$ T-Zellen scheinen sowohl auf die Reifung und Funktion von dendritischen Zellen einzuwirken als auch teilweise deren Funktion zu erfüllen, indem sie Antigene für $\alpha\beta$ T-Zellen präsentieren. In ähnlichem Ausmaß wie bei dendritischen Zellen kommt es nach Aktivierung zur Hochregulation von MHC I und MHC II Molekülen sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 [58]. Auch konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte V γ 9-V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage sind opsonierte Zellen zu phagozytieren [59, 60]. Ein Überblick über diese Funktionen ist in Abbildung 2 zu sehen.

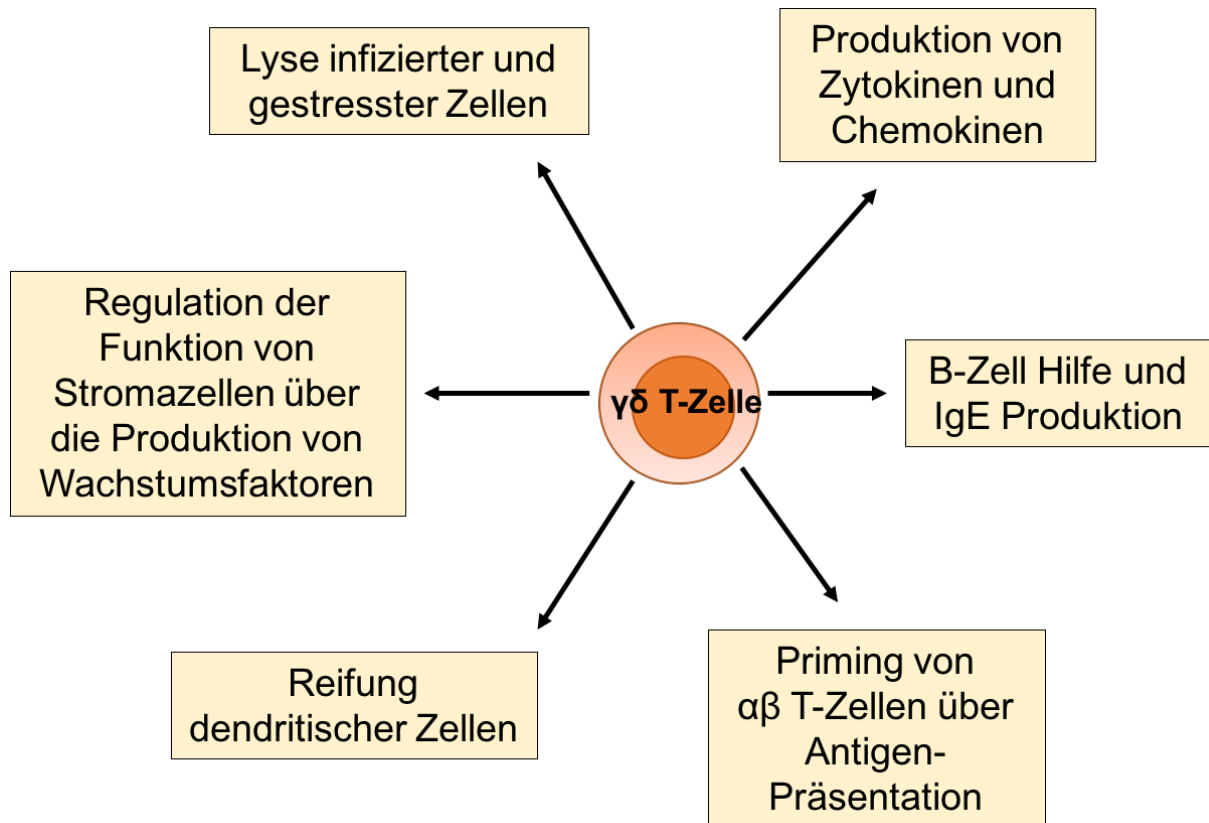


Abbildung 2: Übersicht über verschiedene Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen können verschiedene wichtige Funktionen in der Immunantwort wahrnehmen. Dies kann durch sechs wichtige Funktionsbereiche erreicht werden: $\gamma\delta$ T-Zellen können gestresste oder infizierte Zellen direkt lysieren. Sie können verschiedene Chemokine und Zytokine produzieren und dadurch andere Zellen regulieren. Weiterhin leisten sie B-Zell Hilfe und fördern die Produktion von IgE-Antikörpern. $\gamma\delta$ T-Zellen können Antigene für $\alpha\beta$ T-Zellen präsentieren und zur Reifung dendritischer Zellen beitragen. Außerdem können sie über die Produktion von Wachstumsfaktoren die Funktionen von Stromazellen beeinflussen [22]. Abbildung modifiziert nach Vantourout und Hayday 2013[22].

2.1.2 $\gamma\delta$ T-Zellen beim Huhn

Auch beim Huhn lassen sich T-Zellen mit $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor von solchen mit $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor unterscheiden. 1988 beschrieben Sowder et al. eine T-Zell-Subpopulation, die ein Homolog des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptors des Säugers exprimiert [7].

2.1.2.1 Genetische Organisation der $\gamma\delta$ TZR-Gene beim Huhn

Die genetische Organisation der TZR-Gene ist der beim Säuger ähnlich. Auch beim Huhn finden sich die TZR α - und TZR δ -Gene in einem gemeinsamen TZR α/δ Cluster, wobei die für TZR δ kodierenden VDJC-Gene zwischen den 50 V α - und 48 J α - Genen liegen [61-63]. In diesem auf Chromosom 27 liegenden Cluster können 27 der V α -Segmente auch mit δ -Segmenten rearrangiert werden. Es gibt ein einziges C α -Gensegment [62, 63]. Der sogenannte

klassische TZR δ Locus umfasst 36 V δ -Gene, zwei D δ -, zwei J δ - und ein C δ -Gen [63]. V α - und V δ -Gene können mit beiden J δ -Segmenten und mit einem, beiden oder keinem D δ -Segment rearrangieren, was zu einer hohen kombinatorischen Diversität führt [62]. Zusätzlich wurde bei hühnerartigen Vögeln ein zweiter TZR δ Locus gefunden, der sich beim Haushuhn auf Chromosom 10 befindet. Dieser umfasst je ein einziges V δ -, J δ - und C δ -Segment. Da dieses V δ -Segment eine engere Verwandtschaft zu IgH V-Segmenten als zu anderen V δ -Segmenten aufweist, wird es auch als V_H δ -Segment bezeichnet [64].

Die TZR γ -Gene sind auf Chromosom 2 lokalisiert. 1996 veröffentlichten Six et al. [65] die Charakterisierung der TZR γ -Gene beim Huhn. Die etwa 30 V γ -Gene lassen sich drei Genfamilien mit jeweils acht bis zehn Mitgliedern zuordnen. Drei J γ - und ein C γ -Gensegment vervollständigen den Locus. In der Embryonalentwicklung beginnen die Mitglieder aller drei V γ -Genfamilien während der ersten Entwicklungswelle der Thymozyten gleichzeitig mit dem Rearrangement. Sie können mit allen J γ -Genen rearrangieren. So entsteht bereits früh in der Entwicklung ein im Vergleich zur Maus hoch diverses Repertoire von TZR γ -Ketten [65]. Six et al. argumentieren, dass das im Vergleich zu Maus und Mensch häufigere Vorkommen von $\gamma\delta$ T-Zellen bei Hühnern, aber auch Rindern, Schweinen und Schafen, mit einem komplexeren TZR γ und TZR δ Locus assoziiert ist [21, 65]. Schematisch ist die genetische Organisation der TZR α/δ , TZR δ und TZR γ Loci beim Huhn in Abbildung 3 dargestellt.

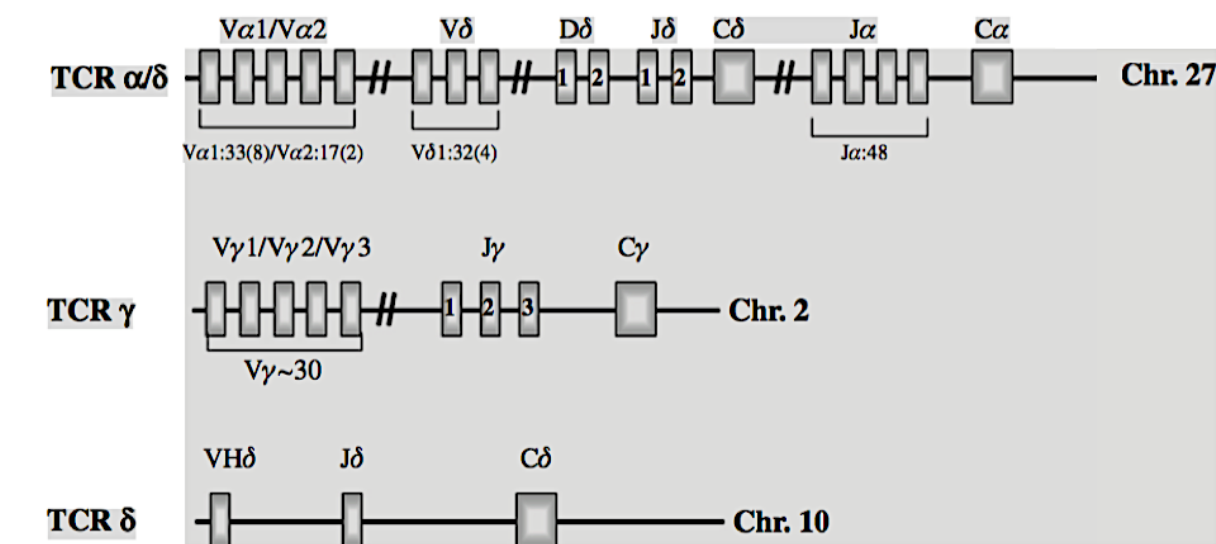


Abbildung 3: Organisation der TZR (T cell-receptor, TCR) α , TZR δ - und TZR γ -Gene beim Huhn

Auf Chromosom 27 finden sich die V δ -, J δ -, D δ - und C δ -Gene zwischen den V α - und J α -Genen. Zusätzlich gibt es auf Chromosom 10 je ein weiteres V δ -, J δ - und C δ -Gen. Auf Chromosom 2 liegen die V γ - und J γ -Gene sowie ein einziges C γ -Gen. Abbildung modifiziert nach Smith und Göbel [66].

2.1.2.2 Eigenschaften und Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen beim Huhn

Im Vergleich zu Mensch und Maus findet sich beim Huhn ein deutlich höherer Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen. Diese können bis zu 50 % der peripheren Lymphozyten ausmachen [7, 67] und kommen, anders als beim Säuger, auch im Blut in relativ hoher Anzahl vor [68]. In der Regel sind 20-25 % der T-Zellen im Blut $\gamma\delta$ T-Zellen [8], in älteren Hühnern sind $\gamma\delta$ T-Zellen die vorherrschende T-Zell-Population und stellen bis zu 48 % der T-Zellen im Blut von 6 Monate alten Tieren [69]. In verschiedenen Geweben wie Darmepithel und Milz sind sie ebenfalls weit verbreitet [8, 68]. Daher kann vermutet werden, dass $\gamma\delta$ T-Zellen beim Huhn eine wichtige Rolle in der Immunüberwachung einnehmen. Allerdings ist, wie auch beim Säuger, über die tatsächlichen Funktionen noch relativ wenig bekannt. So ist noch unbekannt, welche Antigenbindekapazität $\gamma\delta$ T-Zellen beim Huhn besitzen, ob sie wie beim Säuger alternative Antigene erkennen oder wie $\alpha\beta$ T-Zellen an MHC Moleküle gebundene Antigene erkennen [66]. Erwiesen ist, dass auch die $\gamma\delta$ T-Zellen des Huhns in der Lage sind, Zytokine und Chemokine zu produzieren und als zytotoxische Zellen zu agieren [8]. Außerdem können sie immunregulatorische Funktionen wahrnehmen [70].

Es existiert keine standardisierte Einteilung von $\gamma\delta$ T-Zellen in Subpopulationen über Speziesgrenzen hinaus [71]. Beim Huhn erfolgt die Einteilung anhand der Expression des CD8-Moleküls [71]. Es werden drei Subpopulationen unterschieden. CD8 α negative $\gamma\delta$ T-Zellen (CD8 α^-), CD8 α gering positive $\gamma\delta$ T-Zellen (CD8 α^{+dim}) und CD8 α hoch positive $\gamma\delta$ T-Zellen (CD8 α^{+high}) [72]. In der Gruppe der CD8 α^{+high} $\gamma\delta$ T-Zellen wird der CD8 $\alpha\alpha$ Homodimer tragende Subtyp (CD8 $\alpha\alpha^+$) vom CD8 $\alpha\beta$ Heterodimer tragenden Subtyp (CD8 $\alpha\beta^+$) unterschieden [72]. Je nach untersuchter Lokalisation und Alter des Huhns variieren die Anteile dieser Subpopulationen an den $\gamma\delta$ T-Zellen [73]. Dabei unterscheiden sich die Subpopulationen in Hinblick auf das Transkriptionsniveau immunrelevanter Gene wie IFN γ und Fas-Ligand (FasL). In CD8 α^{+high} $\gamma\delta$ T-Zellen konnten generell höhere Transkriptions- und Expressionsniveaus von IFN γ und FasL nachgewiesen werden als in den anderen Subpopulationen [73]. Die CD8 $\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen scheinen dabei die am weitesten differenzierte und voraktivierte Population zu sein [72].

Der genetische Hintergrund einer Hühnerlinie nimmt ebenfalls Einfluss auf die Aktivierbarkeit und Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen. Polasky et al. veröffentlichten 2016 eine Studie, in der *in vitro* stimulierte Blutlymphozyten vier verschiedener Hühnerlinien in Hinblick auf Proliferation und Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen verglichen wurden [71]. Es zeigte sich, dass die hochleistende

Weißleger-Linie WLA White Leghorn durchwegs die höchsten Proliferations- und Aktivierungsniveaus im Vergleich zu der niedrig leistenden Weißleger-Linie R11 White Leghorn und zu den Braunleger-Linien BLA Rhode Island Red und L68 New Hampshire aufwies [71].

Auch für die Erforschung der $\gamma\delta$ T-Zellen des Huhns wurden einige Untersuchungen im Infektionsmodell durchgeführt: Nach oraler Infektion von Eintagsküken mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium kam es zu einem starken Anstieg der Anzahl von $CD8\alpha^{+high}\gamma\delta$ T-Zellen, zuerst und am deutlichsten im Blinddarm, wenig später auch im Blut und in der Milz [72]. Dabei erfuhren die $CD8\alpha^{+}\gamma\delta$ T-Zellen den höchsten Anstieg, was sich auch in einer Erhöhung der Transkriptionsrate des $CD8\alpha$ -Gens zeigte [72]. Die $CD8\alpha^{+high}\gamma\delta$ T-Zellen zeigen erhöhte Transkriptionsniveaus von $IFN\gamma$, Fas und FasL sowie von CD25 (α Untereinheit des Interferon-2-Rezeptors) [72]. CD25 gilt als Marker für aktivierte T-Zellen [71]. FasL erscheint auf aktivierten T-Zellen und das Fas-FasL System reguliert die T-Zell Homöostase sowie die Zytotoxizität [74]. $IFN\gamma$ ist ein Marker für eine T-Helfer-1 abhängige Immunantwort. Es wäre folglich möglich, dass die $CD8\alpha^{+high}\gamma\delta$ T-Zellen zur Entwicklung einer solchen beitragen [72].

Weitere Forschung ist nötig, um die genauen Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen in Hühnern und anderen $\gamma\delta$ T-Zell reichen Spezies aufzudecken. Hilfreich dafür wäre es, wenn transgene Tiermodelle wie $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Hühner zur Verfügung stünden.

2.2 TECHNOLOGIEN ZUR GENERIERUNG GENETISCH VERÄNDERTER HÜHNER

Die Möglichkeit, transgene Hühner zu generieren, ist nicht nur für die Wissenschaft wie die Immunologie und die Entwicklungsbiologie von Bedeutung, sondern könnte beispielsweise durch die Etablierung krankheitsresistenter Linien auch für die Agrarwirtschaft und den Tierschutz eine Rolle spielen. Außerdem kann das leicht zugängliche Hühnerei als Bioreaktor zur Produktion pharmazeutisch bedeutsamer Proteine verwendet werden [75, 76].

Vor allem in der Forschung am Mausmodell gehört das Erzeugen transgener Tiere seit einigen Jahrzehnten zu den Standardtechnologien [77]. Bei der Etablierung transgener Säugetiere finden vor allem drei Methoden Anwendung: die Mikroinjektion von DNA in den Pronukleus der Eizelle, die Transfektion embryonaler Stammzellen und deren Rückführung in die Blastozyste sowie die Infektion von Embryonen mit retroviralen Vektoren [77, 78]. Außerdem können Fibroblasten *in vitro* genetisch verändert werden, um anschließend zur Produktion von

Zygoten aus enukleierten Eizellen zu dienen [79]. Vor allem aufgrund der Reproduktionsphysiologie der Vögel können die beim Säuger angewendeten Methoden häufig nicht direkt auf das Huhn übertragen werden, denn die ersten 24 Stunden der Embryonalentwicklung finden bereits vor der Eiablage im Ovidukt der Henne statt. Zum Zeitpunkt der Eiablage besteht der Hühnerembryo bereits aus etwa 60000 Zellen [80].

2.2.1 Generierung genetisch veränderter Hühner durch Verwendung retroviraler Vektoren

Retroviren sind eine Familie behüllter, einzelsträngiger RNA-Viren. Es ist Bestandteil ihres Lebenszyklus, ihre genetische Information als doppelsträngiges DNA-Provirus in das Genom der Wirtszelle zu integrieren [81]. Daher eignen sie sich als Vektoren zur Einführung genetischer Information wie beispielsweise bei der Generierung transgener Hühner [75]. Die ersten transgenen Hühner wurden 1989 unter Verwendung eines replikations-kompetenten Aviäre Leukosevirus (ALV)-Vektors erzeugt, indem infektiöses Virus in den Dotter eines befruchteten Eies nahe der Keimscheibe injiziert wurde [82]. Des Weiteren wurden replikations-defiziente Vektoren aus Retikuloendotheliose Virus [83, 84] und ALV [84] eingesetzt. Eine Modifikation der Keimbahn und somit Generierung von voll transgenem Nachwuchs bei Verwendung der genannten Vektoren ist zwar prinzipiell möglich, allerdings mit sehr geringer Effizienz. Nur bei einem geringen Anteil der auf diese Weise erzeugten chimärischen Hähne konnte eine genetische Modifikation der Keimbahn und anschließend eine erfolgreiche Weitergabe der genetischen Veränderung an die Nachzucht (Keimbahn-Transmission) erreicht werden [84, 85].

2004 gelang es McGrew et al. neuere retrovirale Vektoren auf Basis von Lentiviren mit höherer Effizienz einzusetzen [84]. Lentiviren aus der Familie der Retroviren sind in der Lage auch ruhende Zellen effizient und stabil zu transduzieren [81]. McGrew et al. fügten Reportergene wie *green fluorescent protein* (GFP) in die Vektoren ein, um die Analyse der transgenen Hühner zu erleichtern [84]. Die viralen Vektoren wurden in die subgerminale Kavität unter der sich entwickelnden Keimscheibe eines frisch gelegten Eies in Stadium X [86] injiziert [84]. Aus 27 % der injizierten Eier schlüpften Küken. Alle männlichen Chimären dieser Studie hatten Anteile transgenen Spermatozoen, als dieses per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht wurde. Anpaarungen ergaben eine Keimbahn-Transmission von 4-45 %. Anschließend wurde das Transgen gemäß der Mendelschen Vererbungslehre stabil vererbt. Eine Abschwächung der Transgen-Expression in nachfolgenden Generationen durch epigenetisches Silencing wurde nicht festgestellt [84].

Der Einsatz lentiviraler Vektoren ist sehr gut dazu geeignet, neue Gene in das Hühnergenom einzufügen und kann beispielsweise zur Expression therapeutisch bedeutsamer Proteine im Eiklar eingesetzt werden. 2007 beschrieben Lillico et al. die Expression rekombinanter Proteine im Ovidukt transgener Legehennen [87]. Zur Generierung dieser Hennen wurde ein aus dem Equine Infektiöse Anämie Virus gewonnener lentiviraler Vektor verwendet. Um die Expression der Proteine auf das Ovidukt zu beschränken wurden regulatorische Sequenzen des Ovalbumin-Gens in den Vektor eingefügt. Ovalbumin ist mit einem Anteil von über 50 % das mengenmäßig bedeutsamste Protein im Eiklar und wird im Ovidukt synthetisiert. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass transgener Nachwuchs die rekombinanten Proteine ausschließlich im Ovidukt exprimiert. Die rekombinanten Proteine konnten erfolgreich aus dem Eiklar aufgereinigt werden [87].

Die Nachteile der retroviralen Vektoren liegen in der zufälligen Integration in das Hühnergenom sowie in Sicherheitsbedenken, wie der Gefahr der Rekombination mit Wildtyp-Viren. Zusätzlich werden mit dem erwünschten Transgen auch Bestandteile viraler DNA in das Hühnergenom eingesetzt. Ebenfalls nachteilig ist die limitierte Größe des Transgens, das integriert werden kann [75, 78].

2.2.2 Generierung genetisch veränderter Hühner durch DNA Mikroinjektion

Love et al. gelang es 1994 transgene Hühner durch Mikroinjektion von DNA zu erzeugen [78]. Diese Methode hat gegenüber der Verwendung von retroviralen Vektoren den Vorteil, dass auch DNA-Moleküle größer als 10 kb keine Limitierung darstellen. Um an befruchtete Eier mit noch nicht verschmolzenen Pronuklei zu gelangen wurden sich entwickelnde Eier aus dem Ovidukt von Hennen entnommen, die ihr letztes Ei zweieinhalb Stunden zuvor gelegt hatten. Anschließend wurde die DNA in den Pronukleus der Keimscheibe injiziert. Die noch schalenlosen Eier wurden in Ersatz-Eischalen weiter bebrütet. Zum Nachweis der injizierten DNA wurden PCR-Reaktionen mit DNA-Proben aus den Geweben von Embryonen und geschlüpften Küken durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass 46 % der Tiere negativ für die injizierte DNA waren, 48 % waren Mosaike mit unterschiedlicher Verteilung des Transgens in verschiedenen Geweben. 6 % zeigten ein Äquivalent zu mindestens einer Kopie des Transgens in jeder Zelle der untersuchten Gewebe. Einer der Mosaik-Hähne wurde mit einer Keimbahn-Transmission von 3,4 % angepaart [78]. Nachteilig an dieser Methode sind die geringe Keimbahn-Transmission sowie der hohe Arbeitsaufwand.

2.2.3 Generierung genetisch veränderter Hühner unter Verwendung primordialer Keimzellen

Ein großer Fortschritt in der Generierung transgener Hühner wurde durch die Etablierung von Methoden zur Isolierung, Kultivierung und Transfektion primordialer Keimzellen (PGCs) erreicht [75, 88]. Bis jetzt sind Hühner die einzige Spezies, deren PGCs unbegrenzt kultiviert und genetisch verändert werden können [89].

2.2.3.1 Primordiale Keimzellen: Isolierung, Kultur, Transfektion und Transplantation

Bei PGCs handelt es sich um 14-19 μm große Zellen mit einem großen Kern und zahlreichen Lipidtröpfchen im Zytoplasma [90]. PGCs sind die Vorläuferzellen der Gameten und durchlaufen während der Embryogenese von Vögeln eine einzigartige Wanderung [75]. Sie entstammen dem Epiblast und wandern von dort in den zum Hypoblast gehörenden Germinal Crescent ein, wo sie ab Hamburger und Hamilton (H&H) Stadium 4 zu finden sind [75, 90]. Ab H&H Stadium 10-12 wandern die PGCs aus dem Germinal Crescent über den Sinus Terminalis und die vorderen Dottervenen in das Blutgefäßsystem [92]. Dort zirkulieren sie mit dem Blut, bis sie schließlich die Gonadenanlage besiedeln, wo sie sich später zu Eizellen oder Spermien differenzieren [75, 90]. Ab H&H Stadium 17 ist der Großteil der PGCs in der Gonadenanlage zu finden [92]. Während der Zirkulation in den Gefäßen finden auch mitotische Teilungen statt [75, 90]. Abbildung 4 zeigt wichtige Stationen der Migration der PGCs.

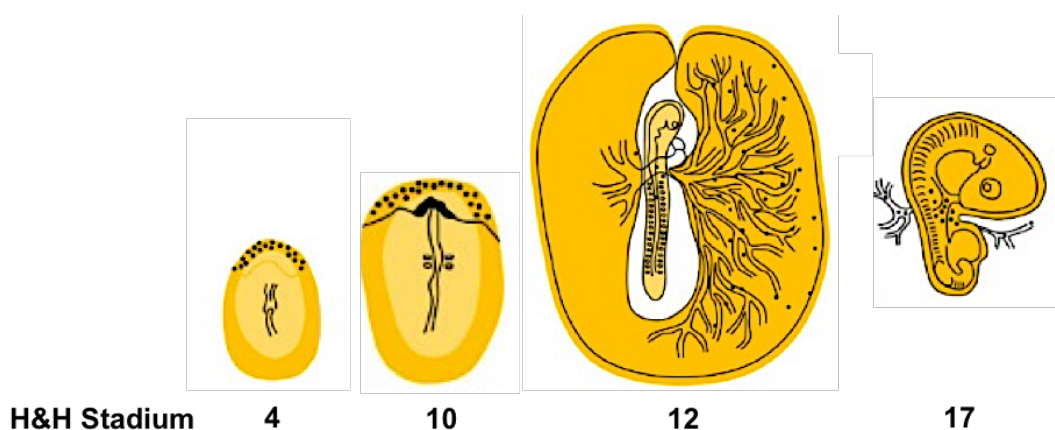


Abbildung 4: Migration der PGCs während der Entwicklung des Hühnerembryos

Ab Hamburger und Hamilton (H&H) Stadium 4 sind die PGCs im Germinal Crescent angesiedelt. Von H&H Stadium 10-12 an wandern die PGCs ins Blutgefäßsystem ein, wo sie mit dem Blut zirkulieren und die Gonadenanlagen besiedeln. Bei einem H&H Stadium 17 Embryo ist bereits ein Großteil der PGCs in der Gonadenanlage zu finden. Abbildung modifiziert nach Nieuwkoop und Sutasurya [93] sowie Lee et al. [94].

Bei den ersten erfolgreichen Versuchen durch Transplantation von PGCs in das Gefäßsystem von Empfänger-Embryonen Keimbahn-Chimären zu generieren, wurden aus embryonalem Blut oder Germinal Crescent isolierte PGCs verwendet [90, 95, 96]. Dabei konnten Keimbahn-Transmissionsraten von bis zu 96 % erreicht werden [90, 95, 96]. Somit stand fest, dass diese Technologie großes Potential für die Generierung transgener Hühner birgt [96]. Um PGCs aus dem Blut von H&H Stadium 13-15 zur Transplantation in Rezipienten-Embryonen zu gewinnen, wurden die Zellen per Dichtegradient-Zentrifugation angereichert [95, 97]. Bedeutsam hierfür ist auch, dass PGCs nach Kryokonservierung die Fähigkeit bewahren die Gonadenanlagen zu besiedeln und sich zu Gameten zu differenzieren [98]. Auch aus den Gonaden von H&H Stadium 28 gewonnene PGCs können erfolgreich zur Generierung von Keimbahn-Chimären verwendet werden [99, 100].

Ein Durchbruch in der Nutzung von PGCs gelang van de Lavoie et al. in 2006 [88]. Sie konnten zeigen, dass es möglich ist PGCs zu isolieren, langfristig zu kultivieren und genetisch zu modifizieren, während die Zellen ihre Keimbahn-Spezifität bewahren. Aus dem Blut von H&H Stadium 14-17 Embryonen isolierte PGCs wurden unter speziellen Kulturbedingungen auf einer Lage von *feeder* Zellen kultiviert. Auch nach 280 Tagen in Kultur behielten die Zellen ihren charakteristischen Phänotyp und zeigten weiterhin Expression der Keimbahn-spezifischen Proteine *chicken vasa homologue* und *ovomucin-like protein*. Keimbahn-Transmissionsraten von mit bis zu 110 Tagen in Kultur gehaltenen PGCs erzeugten Chimären lagen bei bis zu 86 % und damit in derselben Größenordnung wie bei der Verwendung frisch isolierter PGCs. Außerdem konnten Elektroporationsbedingungen gefunden werden, die es möglich machten die Zellen mit einem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) -Gen und Puromycin-Resistenz-Gen enthaltenden linearisierten Plasmid zu transfizieren und die erfolgreich transfizierten Zellen anschließend mit Puromycin zu selektieren [88]. Dabei war es nötig, HS4-Insulator Elemente in die Konstrukte zu integrieren, da es sonst zu einem Silencing der integrierten Gene kam [101]. Nach Injektion in das Gefäßsystem von H&H Stadium 13-15 Embryonen konnten bei Anpaarungen dieser Keimbahn-Chimären Transmissionsraten von 0 bis 92 % erreicht werden. Entsprechend der Mendelschen Vererbungslehre trug die Hälfte der von diesen PGCs abstammenden Küken das eGFP-Gen und exprimierte eGFP. In dieser Studie wurde weiterhin gezeigt, dass PGCs nicht zur Entwicklung somatischer Gewebe beitragen, sondern auf die Keimbahn beschränkt sind. Außerdem führt die Injektion weiblicher PGCs in männliche Rezipienten nicht zu Keimbahn-Transmission und umgekehrt [88]. Abbildung 5 zeigt schematisch die Generierung transgener Hühner unter Verwendung genetisch veränderter PGCs.

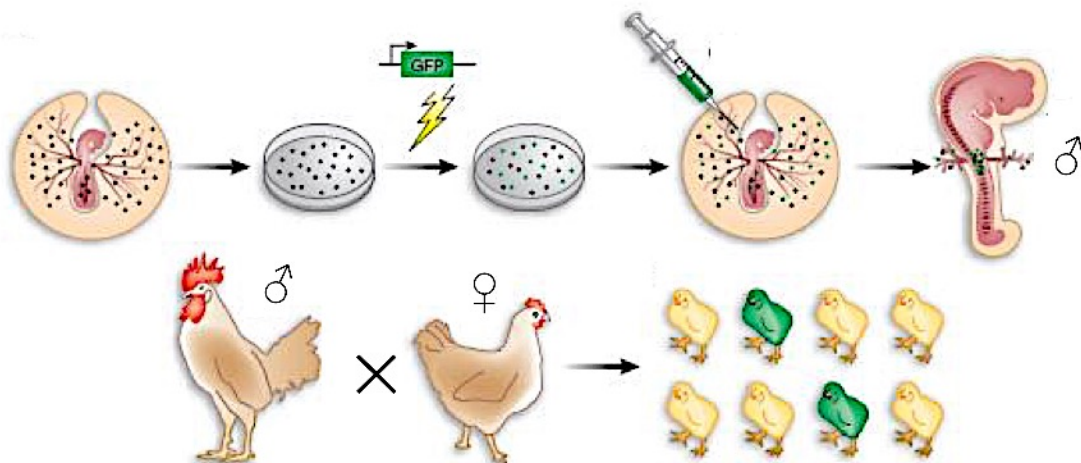


Abbildung 5: Generierung transgener Hühner unter Verwendung transfizierter primordialer Keimzellen

Nach Isolierung von PGCs aus dem Embryo können diese kultiviert und mit einem Transgen (hier GFP) transfiziert werden. Transfizierte PGCs werden in das Gefäßsystem von Empfänger-Embryonen injiziert und besiedeln dann die Gonaden. Bei Verwendung männlicher PGCs werden so männliche Keimbahn-Chimären erzeugt, die neben der endogenen Spermaproduktion auch von den injizierten PGCs abstammende Spermien produzieren können. Bei Anpaarung mit Wildtyp Hennen können so voll transgene Nachkommen entstehen. Modifiziert nach Helen Sang [102].

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Nutzbarmachung von PGCs war die Entwicklung verlässlicher, *feeder* Zell freier und vollständig definierter Kulturbedingungen durch Whyte et al. 2015 [89].

Vorteile in der Verwendung von kultivierten, transfizierten PGCs zur Generierung transgener Hühner liegen unter anderem in der unlimitierten Größe des eingefügten Transgens und in der Möglichkeit, die Insertionsstellen in den Zellen *in vitro* zu untersuchen [101]. Bislang ist unbekannt, warum einige PGC Linien bessere Ergebnisse bei der Keimbahn-Transmission aufweisen als andere und es auch innerhalb von Keimbahn-Chimären der gleichen PGC Linie große Unterschiede bezüglich der Keimbahn-Transmission gibt [103].

2.2.3.2 Effiziente Transfektion von PGCs

Eine Schwierigkeit bei der Verwendung von PGCs zur Generierung transgener Hühner stellt die niedrige Integrationsfrequenz transfizierter Plasmide dar [101]. Es wurden verschiedene Methoden getestet, um die Integrationsfrequenz von Genen in das Genom von PGCs zu erhöhen. Waren keine HS4-Insulator Elemente im transfizierten Konstrukt enthalten, so konnten gemäß Leighton et al. keine stabil transfizierten Klone selektiert werden [101]. Bei

Verwendung von HS4-Insulatoren war die Effizienz zur Erzeugung stabil transfizierter Zellklone mit 0,2-0,36 pro 1×10^6 Zellen immer noch sehr niedrig [101]. Wurden die Integrationsstellen der Transgene in den so transfizierten Zelllinien untersucht, zeigte sich, dass die Integration überwiegend in den Promoterregionen von in PGCs exprimierten Genen stattfand. Vermutlich führt die Insertion in andere Bereiche zu epigenetischem Silencing der eingefügten Gene, wodurch die Antibiotikaresistenz nicht exprimiert wird und somit keine erfolgreiche Selektion der transfizierten Zellen möglich ist [101].

2008 beschrieben Leighton et al. dass durch die Verwendung von phiC31 Integrase die Integrationsfrequenz in PGCs nach Transfektion deutlich erhöht werden kann [101]. phiC31 Integrase ist ein aus Bakteriophagen stammendes Enzym, das die sequenzspezifische Rekombination zwischen attB-Rekombinationsstellen (*attachment site*) und attP-Rekombinationsstellen vermittelt [104]. Das Genom zahlreicher Spezies, wie auch des Huhns, enthält sogenannte pseudo attP-Rekombinationsstellen, die ausreichend Homologien zu att-Rekombinationsstellen aufweisen, um von der Integrase erkannt zu werden [101]. Bei der Kotransfektion von einem attB-Rekombinationsstelle enthaltenden Konstrukt und einem phiC31 Integrase Expressions-Konstrukt stieg die Frequenz, mit der stabil transfizierte Zellklone selektiert werden konnten, auf fünf bis zehn Klone pro 1×10^6 Zellen an. Die Analyse der Integrationsstellen ergab, dass die transfizierten Gene überwiegend in repetitiven DNA-Sequenzen integriert hatten, wodurch es vermutlich nicht zu einer Beeinträchtigung von Wirtsgenen kommt [101].

Neben der phiC31 Integrase kann auch die Verwendung von Transposons zu einer gesteigerten Integrationseffizienz in PGCs führen. DNA Transposons sind im Genom zahlreicher Spezies natürlich vorkommende springende DNA Elemente. Sie können mittels eines „*cut-and-paste*“ Mechanismus Gene von einem Locus an einen anderen übertragen [105]. Dieser Vorgang wird von einem Transposase-Enzym katalysiert, das vom Transposon kodiert wird [105]. Die Transposase erkennt sogenannte *inverted terminal repeats* (ITRs), die das Transposon flankieren, und leitet dann die Umlagerung ein [105, 106]. Für die Umlagerung sind nur die ITRs und die Transposase nötig, was zur Entwicklung einfacher Gentransfer-Vektoren geführt hat. Diese Vektoren bestehen aus dem gewünschten Transgen, flankiert von den ITRs des Transposons [106]. Die zugehörige Transposase kann als mRNA oder in Form eines Expressionsvektors zur Verfügung gestellt werden [106].

MacDonald et al. veröffentlichten 2012 eine Studie über die effiziente Verwendung von piggyBac und Tol2 Transposons zur genetischen Modifikation von Hühner-PGCs [106]. Das

piggyBac Transposon wurde ursprünglich aus dem Genom des Nachtfalters *Trichoplusia ni* isoliert [107], das Tol2 Transposon aus dem Genom des Medaka-Fisches *Pryzias latipes* [108]. Beide wurden bereits in zahlreichen Spezies zur Modifikation des Genoms verwendet [106, 109]. In der Studie von MacDonald et al. wurden PGCs mit je einem dieser beiden Transposon-Vektoren transfiziert, in die Markerkassette war jeweils ein eGFP- und ein Puromycin-Resistenz-Gen eingefügt [106]. Drei Wochen nach der Transfektion wurde der Anteil an eGFP-positiven Zellen bestimmt, um die Effizienz der stabilen Transfektion zu bewerten. Bei Verwendung des piggyBac Transposons waren 10,5 % der PGCs eGFP-positiv, bei Verwendung des Tol2 Transposons 45,2 %. Dabei brachte das Einfügen von HS4-Insulatoren um die Markerkassette in dieser Studie keinen Vorteil [106]. Eine Studie von Park und Han aus demselben Jahr bestätigt diese Ergebnisse [110]. Sie integrierten mittels piggyBac Transposon ein GFP-Gen in das Genom einer PGC Linie. Transgene PGCs wurden in Empfänger-Embryonen injiziert. So generierte Keimbahn-Chimären zeigten Transmissionsraten von 90,4 bis 98,9 % [110]. Diese beiden Veröffentlichungen zeigen, dass Transposons sehr gut geeignet sind, um Transgene in das Genom von PGCs einzufügen.

Tyack et al. verwendeten Transposons, um *in vivo* Modifikationen am Genom von PGCs vorzunehmen [111]. Sie nutzten hierfür den Zeitraum während der Embryonalentwicklung aus, in dem die PGCs mit dem Blut zirkulieren. Nach Injektion einer Mischung aus einem miniTol2-Plasmid, das ein eGFP-Gen und die ITRs enthielt, einem für die Tol2 Transposase kodierendem Plasmid und dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 in das Gefäßsystem von H&H Stadium 14 Embryonen konnten an Inkubationstag 14 eGFP-positive Zellen in den Gonaden der injizierten Embryonen nachgewiesen werden. Bis zum Schlupf inkubierte männliche Tiere wurden aufgezogen und nach Erreichen der Geschlechtsreife wurde ihr Sperma mittels quantitativer Real Time PCR auf Vorhandensein des eGFP-Gens untersucht. 45 % der Hähne waren hierbei positiv. Die drei Hähne mit den höchsten Raten an eGFP-positivem Sperma wurden mit Wildtyp Hennen angepaart und der Nachwuchs auf eGFP Expression untersucht. Zwei der Hähne zeigten Keimbahn-Transmission mit einer Rate von 1,5 %. Diese Methode bietet eine Möglichkeit, transgene Hühner auch ohne aufwändige Kultivierung von PGCs oder Umgang mit Retroviren zu generieren [111].

2.2.3.3 Gezielte Genmodifikationen in PGCs mittels homologer Rekombination

Ein weiterer wichtiger Fortschritt in den Methoden zur Generierung transgener Hühner war die Entwicklung von Möglichkeiten, gezielte Veränderungen in das Genom kultivierter PGCs

einzufügen. So können Funktionen von Genen spezifisch erforscht werden [75, 101, 112]. Eine Möglichkeit hierfür ist die homologe Rekombination.

Bei der homologen Rekombination handelt es sich um eine Methode, die beispielsweise für die Veränderung von Genen in embryonalen Stammzellen von Mäusen schon länger etabliert ist [112]. Homologe Rekombination ist ein natürlicherweise in allen Organismen vorkommender Mechanismus, der unter anderem zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA nötig ist [113]. Dieser Mechanismus kann zur gezielten Veränderung von Genen genutzt werden, da er auch zur Rekombination zwischen DNA-Sequenzen im Wirtsgenom und in die Zelle eingeführten, klonierten Targeting Vektoren führen kann [114]. Hierfür ist es nötig, dass das einzufügende Gen im Targeting Vektor von sogenannten Homologie-Armen flankiert wird, die zu Sequenzen am Ziellokus im Wirtsgenom homolog sind. Dann ist ein gezielter Einbau eines Gens an einer zuvor festgelegten Stelle im Genom möglich [115]. Einer der wichtigsten Faktoren für eine effiziente homologe Rekombination ist die Verwendung isogener DNA-Sequenzen in den Homologie-Armen der Targeting Vektoren [116]. Abbildung 6 zeigt schematisch den Ablauf der homologen Rekombination.

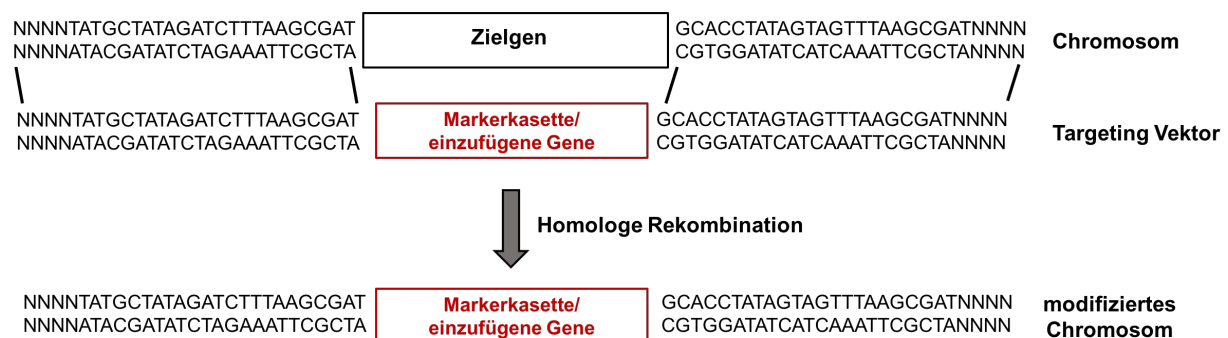


Abbildung 6: Schema der homologen Rekombination

Die Homologie-Arme des Targeting Vektors sind isogen zu den das Zielgen flankierenden Sequenzen im Wirtsgenom. Bei der homologen Rekombination kommt es zu einem Austausch der zwischen den homologen Regionen liegenden Genen und somit zu einem modifizierten Chromosom.

Leighton et al. beschrieben 2008, dass es ihnen gelungen war, in PGCs mittels homologer Rekombination die Gene für die J- und C-Region der Immunglobulin leichte Kette durch eine selektive Markerkassette mit einem Puromycin-Resistenz-Gen zu ersetzen [101]. Hierfür verwendeten sie einen Targeting Vektor mit insgesamt 8,6 kb umfassenden Homologie-Armen, die isogen von genomischer DNA der verwendeten PGC Linie kloniert worden waren. Nach Transfektion und Selektion gelang es ihnen vier Klone aus $1,05 \times 10^8$ transfizierten Zellen zu gewinnen. Bei einem dieser Klone hatte die Markerkassette am gewünschten Locus integriert [101].

Schusser et al. waren 2013 die ersten, denen es gelang, eine Hühnerlinie mit einem gezielten Gen Knock-out zu generieren [112]. Um das J-Gensegment der Immunglobulin schwere Kette (J_H) zu deletieren, verwendeten sie einen isogenen Targeting Vektor mit von LoxP-Stellen flankierten Puromycin-Resistenz- und eGFP-Genen. Zusätzlich war in dieser Markerkassette noch eine attP-Rekombinationsstelle eingefügt, um zukünftige sequenzspezifische Integrationen an diesem Locus mit Hilfe der phiC31 Integrase zu ermöglichen. Die zu den verwendeten PGC Linien isogenen Homologie-Arme umfassten insgesamt 8 kb. Nach Transfektion von PGCs konnten Puromycin-resistente Klone mit einer Frequenz von einem Klon pro 1×10^7 Zellen selektiert werden. Bei 28 % der selektierten Klone hatte die Markerkassette am gewünschten Locus integriert [112]. Dieser auch schon von Leighton et al. beobachtete hohe Anteil an korrekter Integration ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei zufälliger Integration die Expression des Antibiotikaresistenz-Gens unterdrückt wird [101]. Die Keimbahn-Transmission von mit J_H Knock-out PGCs injizierten Keimbahn-Chimären war mit neun positiven Tieren aus 8179 untersuchten Nachkommen niedriger als von PGCs mit zufällig integrierten Transgenen beschrieben [112]. In einer Studie von Schusser et al. 2016 konnten bei Verwendung PGCs mit durch homologe Rekombination herbeigeführtem Knock-out des Immunglobulin leichte Ketten Locus Keimbahn-Transmissionsraten von bis zu 48 % erreicht werden [117]. Nach erfolgreicher Etablierung einer homozygoten J_H Knock-out Hühnerlinie konnte gezeigt werden, dass in diesen Tieren die Entwicklung der B-Zellen nach dem Schlupf blockiert ist [112]. Diese Hühnerlinie bietet jetzt ein einzigartiges Modell zur Erforschung der B-Zell-Entwicklung und der Immunantwort bei Hühnern [112].

2.2.3.4 Gezielte Genmodifikationen in PGCs mittels sequenzspezifischer Nukleasen

Die Entwicklung programmierbarer sequenzspezifischer Nukleasen erlaubt es, präzise Veränderungen im Genom verschiedenster Spezies vorzunehmen. Hierzu gehören *Zink Finger Nucleases* (ZFNs), *Transcription Activator Like Effector Nucleases* (TALENs) und das *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated 9* System (CRISPR/Cas9-System) [118]. Diese Methoden können eine im Vergleich zur homologen Rekombination effizientere gezielte Genmodifikation ermöglichen [119].

Bei ZFN und TALEN handelt es sich um proteinbasierte Systeme. Beide bestehen aus einer DNA-Bindedomäne und einer DNA-Spaltungsdomäne [118]. Bei der Bindedomäne handelt es sich um eine kurze Proteindomäne, die an eine spezifische DNA-Sequenz binden kann [118]. Die Bindedomäne ist mit der Spaltungsdomäne, bestehend aus einer *FokI* Nuklease, verbunden

[120]. Die *FokI* Nuklease ist ein TypII Restriktionsenzym, das voneinander getrennte Bindungs- und Spaltungsaktivitäten besitzt; die Spaltungsaktivität ist nicht sequenzspezifisch [118]. Bindet ein Paar zusammengehörender ZFN oder TALEN Moleküle gegenüberliegend an einen DNA-Strang und bringt so die beiden *FokI* Domänen zusammen, so verursachen diese einen Doppelstrangbruch (DSB) in der spezifischen Zielsequenz [118]. Zur Reparatur des Doppelstrangbruches gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten [119]. Beim *non homologous end joining* (NHEJ) werden die beiden getrennten DNA-Enden wieder zusammengefügt, wobei es häufig zu Mutationen in Form von Insertion oder Deletion von Nukleotiden kommt. Diese Mutationen können durch das Entstehen vorzeitiger Stopcodons oder einer Verschiebung im Leserahmen zum Funktionsverlust des Gens führen [118-121]. Beim *homology directed repair* (HDR) wird der Mechanismus der homologen Rekombination ausgenutzt. Durch eine exogen zugeführte Donor DNA (*repair template*) mit entsprechend großen homologen Bereichen zum endogenen Locus können gezielte Mutationen oder auch gewünschte Gene eingefügt werden [118, 119]. Abbildung 7 zeigt schematisch die verschiedenen Reparaturwege nach Nuklease-induziertem DSB.

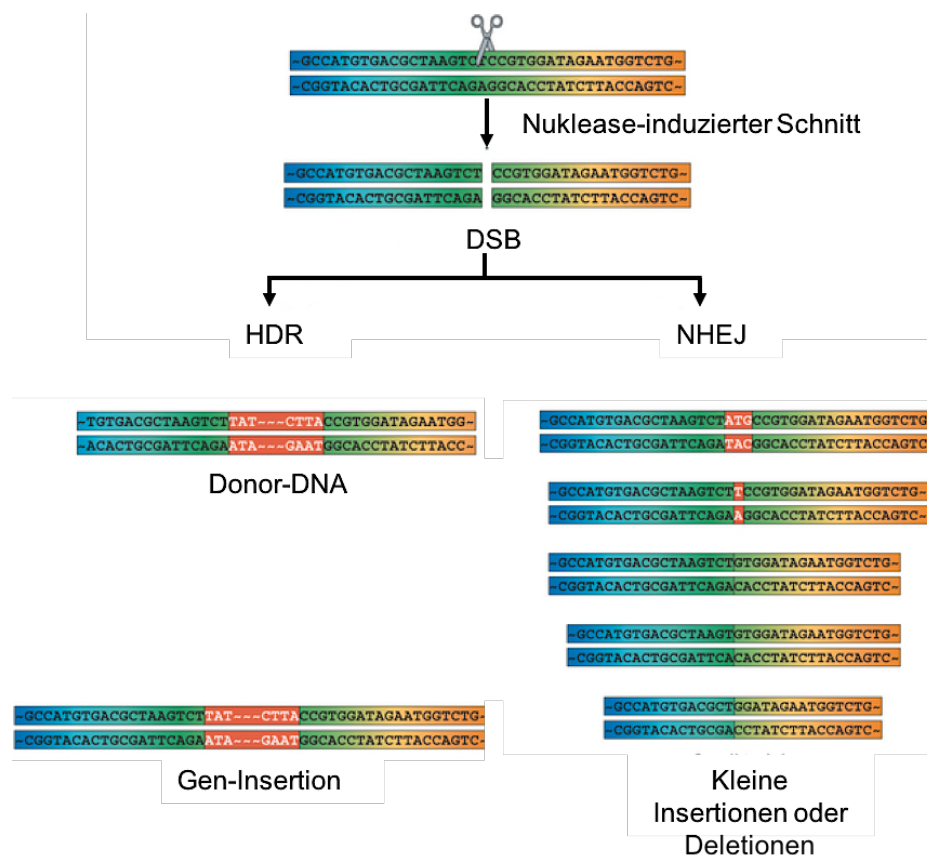


Abbildung 7: Möglichkeiten der Reparatur eines Nuklease-induzierten Doppelstrangbruchs

Ist eine exogen zugeführte Donor-DNA vorhanden, so können mittels *homology directed repair* (HDR) gezielte Veränderungen vorgenommen werden. Bei der Reparatur über *non homologous end joining* (NHEJ) kommt es häufig zu Insertions- oder Deletionsmutationen. Abbildung modifiziert nach Kim und Kim [118]

Park et al. gelang es 2014, mit Hilfe von TALENs spezifische Veränderungen im Genom von PGCs vorzunehmen und mit diesen Zellen eine Hühnerlinie zu generieren [122]. Ziel war es, eine Hühnerlinie mit Knock-out des Ovalbumin-Gens (OV-Gen) zu erstellen. Ovalbumin ist das mengenmäßig bedeutsamste Protein im Eiklar des Hühnereies. Nach Erstellung eines rechten und linken TALEN-Konstrukts zur Modifikation des Startcodons des OV-Gens wurden diese zunächst auf ihre Effizienz in DF-1 Zellen (embryonale Hühner Fibroblasten Zelllinie [123]) hin getestet. In dieser Zelllinie lag die Mutationsfrequenz bei 36,7 % [122]. Anschließend wurde das OV-TALEN Set mit einem GFP-Vektor in PGCs kotransfiziert. Es wurde angenommen, dass die OV-TALENs und der GFP-Vektor von denselben Zellen aufgenommen wurden, sodass zur Anreicherung der erfolgreich transfizierten Zellen nach einem Tag ein *fluorescence-activated cell sort* auf GFP-positive Zellen durchgeführt wurde. Als Transfektionseffizienz wurden 5 % ermittelt. Nach Analyse der modifizierten PGCs zeigte sich, dass durch die OV-TALENs mediierte Mutationen im OV-Gen Deletionen von sechs bis 29 Nukleotiden umfassen, wovon etwa zwei Drittel eine Auswirkung auf den Leserahmen des OV-Gens hatten. Die modifizierten PGCs wurden verwendet, um Keimbahn-Chimären zu generieren. Das Sperma eines Chimären-Hahns wurde sequenziert, wobei sich in 18,8 % der Spermien Mutationen im OV-Gen zeigten. Durch Anpaarung dieses Hahnes konnte diese Mutationen tragender Nachwuchs produziert werden. In diesen Hühnern konnte weder TALEN-Plasmid-DNA noch GFP Expression nachgewiesen werden. Park et al. betonten daher, dass mit Hilfe der TALENs Hühner generiert wurden, die genetisch modifiziert, aber nicht als transgen zu bezeichnen sind, da keine exogenen Transgene im Hühnergenom integriert wurden und keine Fremd-DNA enthalten ist [122]. Die Studie von Park et al. stellt die erste Veröffentlichung zur effizienten Anwendung sequenz-spezifischer Nukleasen zur Generierung genetisch modifizierter Hühner dar.

Somit konnte gezeigt werden, dass TALENs eine Möglichkeit darstellen, gezielte Veränderungen am Hühnergenom vorzunehmen. Jedoch stehen der Anwendung von TALENs und ZFNs Schwierigkeiten des Protein-Designs sowie der Synthese und Validierung der Moleküle im Wege. Das CRISPR/Cas9-System dagegen hat Potential, einfach und kosteneffizient in zahlreichen Laboratorien zum Einsatz zu kommen [75, 122].

Die Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systems begann 1987, als Ishino et al. kurze Wiederholungssequenzen (*Repeats*), unterbrochen von kurzen Sequenz-Stücken (*Spacer*), im Genom von *Escherichia coli* beschrieben [124]. Ein solcher CRISPR Lokus besteht typischerweise aus einigen CRISPR assoziierten (Cas) Genen und dem CRISPR-Array, einer Anzahl sich wiederholender Sequenzen, die durch die variablen *Spacer* getrennt sind. Es zeigte

sich, dass diese Wiederholungen mit noch unbekannter Funktion im Genom zahlreicher Bakterien und Archaea vorkamen [125], jedoch bei Eukaryoten oder Viren fehlten [126]. 2005 stand fest, dass die *Spacer* von Viren oder Plasmiden stammende genetische Information enthielten [127]. Mojica et al. konnten zeigen, dass die Träger der *Spacer* vor Infektion durch das Virus, von dem die Sequenz stammt, geschützt sind [127]. Dadurch lag die Vermutung nahe, dass die CRISPR-Arrays als immunologisches Gedächtnis dienen und Teil eines Abwehrmechanismus in Prokaryoten sind [127]. Einen weiteren wichtigen Hinweis auf die Funktion lieferte die Entdeckung des Cas9-Enzyms, welches Teil des CRISPR Lokus ist und Nuklease-Domänen aufweist [126, 128]. Durch Barrangou et al. erfolgte 2007 der endgültige Nachweis des Abwehrmechanismus, indem gezeigt wurde, dass das CRISPR System in *Streptococcus thermophilus* zur Abwehr von Phagen auf Nukleinsäureebene fähig ist, indem Doppelstrangbrüche in das Genom des Angreifers eingefügt werden [129]. Nach viraler Infektion integrieren die Bakterien neue *Spacer* in ihre CRISPR-Arrays [129]. Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau des CRISPR Lokus von *S. pyogenes*.



Abbildung 8: Schema des CRISPR Lokus von *S. pyogenes*

tracrRNA und Cas-Gen-Cluster gefolgt vom CRISPR-Array, bestehend aus *Repeats* (weiß) und *Spacern* (farbig, nummeriert). Abbildung modifiziert nach R. Heler et al. [130]

Es folgte die genaue Aufklärung der Funktionsweise und der Schlüsselkomponenten des Mechanismus. So zeigte sich, dass Cas9 als einziges Enzym im Cas-Gen-Cluster zur Mediation des Doppelstrangbruchs an der Zielsequenz benötigt wird [131]. Der Komplex mit dem Cas9-Protein wird durch eine CRISPR RNA (crRNA) zur Zielsequenz geleitet [132]. Die crRNA besteht aus einem *Repeat*-Anteil und einem *Spacer*-Anteil. Der DSB wird durch Cas9 in der fremden Nukleinsäure an Stellen induziert, die zum *Spacer*-Anteil der crRNA komplementär sind [133]. Es werden Typ I bis Typ III CRISPR/Cas-Systeme unterschieden. Während Typ I und Typ III Systeme große Komplexe aus mehreren Cas-Proteinen bilden, benötigen Typ II Systeme nur ein einziges Cas9-Protein, um einen RNA-geleiteten DSB herbeizuführen [134, 135]. Ein weiteres Kernelement von Typ II CRISPR-Systemen ist die sogenannte trans-aktivierende crRNA (tracrRNA), welche für die Reifung der crRNA benötigt wird [136]. Somit sind drei Komponenten für die Rekonstitution von Typ II CRISPR-Systemen nötig: Cas9, crRNA und tracrRNA [137]. Jinek et al. zeigten 2012 dass es möglich ist den Komplex aus crRNA und tracrRNA durch eine chimärische *single guide* RNA (sgRNA) zu

ersetzen, die aus einer 20 Nukleotide langen Sequenz zur Festlegung der Spezifität über Watson-Crick-Basenpaarung sowie einer doppelsträngigen Struktur zur Bindung mit Cas9 besteht [134]. Damit die Zielsequenz erkannt wird, ist neben der Basenpaarung zwischen crRNA und DNA-Sequenz außerdem eine kurze DNA-Sequenz, das *protospacer adjacent motif* (PAM), nötig welches auf die Zielsequenz folgt [134].

Dass es prinzipiell möglich ist, Typ II CRISPR-Systeme zwischen Organismen zu transferieren, zeigte 2011 eine Studie von Sapranaukas et al., in der das Typ II CRISPR-System von *Streptococcus thermophilus* auf *Escherichia coli* übertragen werden konnte [135]. 2013 gelang es dann mehreren Gruppen, die Typ II CRISPR-Systeme von *S. thermophilus* und *S. pyogenes* zur Anwendung in Säugerzellen zu modifizieren, wonach die erwarteten Veränderungen durch NHEJ oder HDR nachgewiesen werden konnten [138-140]. Hierbei kann Cas9 entweder durch ein crRNA:tracrRNA Paar oder eine chimärische sgRNA zur Zielsequenz geleitet werden [138]. Es folgte eine rasante Ausbreitung der Anwendung des von *S. pyogenes* stammenden CRISPR/Cas9-Systems als *Genome Engineering* Werkzeug, da im Gegensatz zu ZFNs und TALENs kein *Protein Engineering* nötig ist. Zur Änderung der Spezifität ist lediglich eine Änderung der 20 Nukleotid langen Sequenz in der sgRNA notwendig. Die einzige Einschränkung bei der Auswahl der Zielsequenz ist das Vorhandensein der PAM-Sequenz 5'- NGG - unmittelbar 3' der Zielsequenz [133]. Der von Cas9 induzierte DSB erfolgt drei Basenpaare 5' der PAM-Sequenz [141]. Die Notwendigkeit der PAM-Sequenz schränkt die Zielstelle auf etwa jedes achte Basenpaar im menschlichen Genom ein [138]. Andere Mitglieder der Cas9-Enzym-Familie mit anderen PAM-Spezifitäten könnten zur Ausweitung der möglichen Zielsequenzen nutzbar gemacht werden [138].

Eine besonders anwenderfreundliche Möglichkeit stellen Plasmide dar, in die 20 Nukleotide lange Oligonukleotide, die für die Zielsequenz kodieren, kloniert werden können und die außerdem die genetische Information für Cas9 und den Rest der sgRNA enthalten [138, 141]. Durch Fusion von beispielsweise 2A-GFP oder 2A-Puromycin an Cas9 wird weiterhin die Selektion transfizierter Zellen ermöglicht [141]. Die Genome zahlreicher verschiedener Spezies und Zelllinien wurde inzwischen mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems modifiziert [142].

Bei Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems und anderer sequenzspezifischer Nukleasen können sogenannte *off target* Effekte auftreten, wenn es zur Induktion eines Doppelstrangbruchs bei fehlerhafter Basenpaarung abseits der Zielsequenz kommt. Cas9 toleriert fehlerhafte Basenpaarungen zwischen guide RNA und Zielsequenz. Allerdings

scheinen fehlerhafte Bindungen deutlich häufiger aufzutreten als tatsächliche fehlerhafte Doppelstrangbrüche [143].

Das CRISPR/Cas9-System wurde für spezifische Anforderungen weiter modifiziert. So kann die *S. pyogenes* Cas9 durch gezielte Mutation zu einer Einzelstrangbrüche-katalysierenden Nickase umgewandelt werden [140]. Diese Cas9 Nickase kann zum HDR eingesetzt werden, um im Vergleich zur Wildtyp Cas9 die Gefahr von Mutationen an fehlerhaften Bindungsstellen zu verringern, da Einzelstrangbrüche in der Regel fehlerfrei repariert werden [144]. Außerdem kann durch die Verwendung eines sgRNA Paares bei einem sogenannten *double nicking* Ansatz eine erhöhte Genauigkeit bei der Induktion von DSB erreicht werden [144].

Nach der Erfolgsgeschichte des CRISPR/Cas9-Systems zur Genmodifikation in verschiedensten Zelllinien und Tierarten folgten 2015 und 2016 die ersten Studien zur Anwendung am Hühnergenom [76, 145-148]. Bislang zwei Studien [76, 145] beschreiben die Verwendung des CRISPR/Cas-9 Systems zur Generierung genetisch modifizierter Hühnerlinien. Beide wurden im April 2016 veröffentlicht.

Oishi et al. etablierten sgRNAs zur Modifikation der Gene für Ovalbumin und Ovomucoid (OVA und OVM) [76]. OVA und OVM sind bedeutende Allergene im Eiklar von Hühnereiern. Hühnerlinien mit Knock-out dieser Gene könnten zur Produktion niedrig allergener Eier als Nahrungsmittel oder für die Impfstoffproduktion verwendet werden. Je vier sgRNAs mit einer Zielsequenz nahe des Startcodons des OVA- beziehungsweise OVM-Gens wurden entworfen und in Zellkultur auf ihre Effizienz getestet. Die jeweils effektivste sgRNA für OVA- und OVM-Gen wurde ausgewählt, um Doppelstrangbrüche und darauffolgend Mutationen über NHEJ in kultivierte PGCs einzufügen. Um erfolgreich transfizierte PGCs anreichern zu können wurden Plasmide verwendet, die neben Cas9 und der sgRNA auch für ein entsprechendes Antibiotikaresistenz-Gen kodieren. Nach transienter Transfektion wurden die PGCs an Tag 2-4 mit Neomycin, Zeocin oder Puromycin selektiert. Anschließend wurden die Zellen in antibiotikumfreiem Medium für weitere 14 Tage kultiviert, bevor ein Teil der Zellen zur Analyse der OVA- oder OVM-Sequenzen verwendet wurde. Ohne Selektion lag der Anteil der Zellen mit durch CRISPR/Cas9-System eingefügter Mutation für das OVA-Gen bei 6,7 % und für das OVM-Gen bei 0 %. Diese Anteile konnten durch Selektion mit Neomycin auf 34 % für das OVA-Gen und 13 % für das OVM-Gen erhöht werden. Selektion mit Puromycin oder Zeocin nach Insertion der entsprechenden Resistenz-Gene in den verwendeten Vektor erhöhte diese Anteile weiter auf 90-100 % für beide Loci. Vermutlich weisen die untransfizierten PGCs eine höhere Sensitivität gegenüber Puromycin und Zeocin als gegenüber Neomycin auf. In den

sequenzierten Zellen konnten Deletionen von 1-21 Basenpaaren nachgewiesen werden, wovon die Mehrheit eine Verschiebung des Leserahmens verursachte. Insertionsmutationen traten nicht auf [76].

Um die Keimbahn-Kompetenz der durch CRISPR-Cas9-System modifizierten PGCs zu überprüfen, verwendeten Oishi et al. OVM-mutierte und mit Puromycin selektierte PGCs zur Generierung von Keimbahn-Chimären [76]. Drei männliche Keimbahn-Chimären wurden aufgezogen und ihr Sperma auf das Vorhandensein von Mutationen im OVM-Gen getestet. Bei zwei Hähnen zeigten über 90 % der Spermien die gesuchten Veränderungen, bei dem dritten Tier nur 15 %. Die beiden Keimbahn-Chimären mit hohen Anteilen modifizierten Spermias wurden mit Wildtyp Hennen angepaart. Durch die Verwendung von Federmarkern konnte festgestellt werden, dass 79 % beziehungsweise 67 % des Nachwuchses aus diesen Anpaarungen von den injizierten PGCs abstammte. Bei etwa der Hälfte dieser Nachzucht konnten Mutationen im OVM-Gen nachgewiesen werden, was der erwarteten Verteilung bei Verwendung von PGCs mit heterozygoten Veränderungen des OVM-Genes entspricht. Es wurden Tiere selektiert, bei denen Verschiebungen des OVM-Leserahmens verursachende Mutationen nachgewiesen wurden. Durch Kreuzungen der so entstandenen heterozygoten OVM^{+/-} Hühner konnten homozygote OVM^{-/-} Tiere generiert werden. Schlupf- und Wachstumsraten heterozygoter und homozygoter Tiere waren normal. Genomische DNA der genetisch modifizierten Nachzucht wurde verwendet, um Untersuchungen auf *off target* Effekte und zufällige Integration des Cas9-Plasmids durchzuführen. Zur Untersuchung auf *off target* Effekte wurden drei potentielle *off target* Stellen per PCR amplifiziert und sequenziert, wobei keine unbeabsichtigten Mutationen nachgewiesen werden konnten. Für eine Analyse auf Integration des zur transienten Transfektion verwendeten CRISPR/Cas9-Plasmids wurde ein Primerpaar verwendet, welches das Puromycin-Resistenz-Gen mit sehr hoher Sensitivität nachweisen kann. Bei Einsatz von 10 ng genomischer DNA lag die Nachweisgrenze bei 0,05 Kopien. Auf diese Weise konnte keine zufällige Integration des Plasmids nachgewiesen werden. Daher wurde geschlossen, dass *off target* Effekte und zufällige Plasmidintegration nicht oder mit sehr geringer Frequenz auftraten [76]. Diese Studie konnte zeigen, dass endogene Gene in PGCs mit hoher Effizienz durch das CRISPR/Cas9-System mutiert werden können. Wenn eine Selektion mit Antibiotika durchgeführt wird, kann eine höhere Mutationsfrequenz als mit TALENs erreicht werden [76, 122].

Dimitrov et al. verwendeten das CRISPR/Cas9-System, um eine gezielte Veränderung *upstream* des V-Gens der Immunglobulin schwere Kette einzubringen [145]. Sie setzten ein *repair template* mit insgesamt 2000 bp langen Homologie-Regionen ein, um eine LoxP-Stelle

an dieser Stelle ins Genom einzufügen. Zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen enthielt das *repair template* außerdem ein Hygromycin-Resistenz-Gen als selektierbaren Marker. Nach Kotransfektion eines CRISPR-Vektors mit Cas9 und entsprechender sgRNA sowie dem *repair template* in 5×10^6 Zellen und anschließender Hygromycin-Selektion zeigte sich eine sehr hohe Effizienz mit multiplen Klonen in jeder Delle einer 48-Loch-Flachbodenplatte. Da bei dieser hohen Effizienz nicht die gewünschte klonale Expansion eines Zellklons möglich war, wurde die eingesetzte DNA-Menge von 15 µg je Plasmid auf 2,5 µg je Plasmid verringert. Daraufhin konnten zwölf Klone von einer Transfektion in 5×10^6 selektiert werden. Von neun untersuchten Klonen war das *repair template* bei allen korrekt integriert. Damit konnte durch den Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems eine Erhöhung der Targetingeffizienz erreicht werden. Diese kann bei dem Einsatz von Vektoren für homologe Rekombination ohne CRISPR/Cas9-System zwar bis zu 30 % betragen, jedoch werden deutlich längere Homologie-Arme von bis zu 8 kb benötigt. Die Klonierung solch umfangreicher isogener Homologie-Arme kann bei schlecht charakterisierten oder problematischen Zielsequenzen sehr aufwändig sein [145]. Bei Anwendung in verschiedenen Zelllinien konnte HDR nach CRISPR/Cas9 induziertem DSB schon mit Oligonukleotiden von 100 Nukleotiden Länge erreicht werden [149]. Dimitrov et al. verwendeten fünf der klonal veränderten PGC Linien zur Injektion in Embryonen, um Keimbahn-Chimären zu generieren [145]. Für vier dieser fünf Linien konnte Keimbahn-Transmission mit einer Effizienz von 0-96 % nachgewiesen werden. Die so erzeugte genetisch modifizierte Nachzucht zeigte normales Schlupfverhalten und Wachstum. Untersuchungen auf *off target* Effekte wurden nicht durchgeführt [145].

Diese beiden in 2016 erschienenen Studien zeigen, dass das CRISPR/Cas9-System auch beim Huhn eine gute Alternative für die Etablierung genetischer Modifikationen darstellt und zwar sowohl zur Unterbrechung von Genfunktionen als auch für das gezielte Einfügen von Genen [76, 145]. Die Verwendung des HDR mit klonaler Expansion der PGCs hat den Vorteil, dass jede zur Generierung der Keimbahn-Chimären verwendete Zelle die identische Mutation trägt und diese Mutationen sowie auch mögliche unerwünschte Effekte wie *off target* Mutationen bereits *in vitro* untersucht werden können [145].

3. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, eine transgene Hühnerlinie mit einer Deletion des $C\gamma$ -Gens sowie eine transgene Hühnerlinie mit ubiquitärer mCherry Expression zu erstellen. Hierfür sollten primordiale Keimzellen isoliert, kultiviert, transformiert und zur Generierung von Keimbahn-Chimären und voll transgenen Hühnern genutzt werden. Zur Transformation der PGCs sollten ein mCherry-attB Konstrukt sowie ein Targeting Vektor zur homologen Rekombination am $C\gamma$ Locus kloniert werden.

Weiterhin sollte ermittelt werden, ob mittels CRISPR/Cas9-System eine Effizienzsteigerung beim *gene targeting* in PGCs erreicht werden kann. Daher sollten verschiedene Versuche zur Feststellung der Targetingeffizienz und zur Kombination mit Reparatur-Konstrukten durchgeführt werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang alphabetisch aufgeführten Bezugsquellen.

4.1 TIERE UND TIERHALTUNG

4.1.1 Hühner

Die Zuchttiere der Linie LSL-classic (Lohmanns selected Leghorn classic) stammten von der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven. Die transgene eGFP-Hühnerlinie 165-2 wurde von der Firma Crystal Bioscience, Emeryville, USA zur Verfügung gestellt. Keimbahn-Chimären stammten aus institutseigener Zucht.

In der Regel wurden die Tiere in Gruppen in Volieren mit 2 m² Grundfläche gehalten, die mit Sitzstangen und einem Sandbad ausgestattet waren. Wasser und handelsübliches Alleinfutter stand den Tieren jederzeit zur freien Verfügung.

Die Generierung von Keimbahn-Chimären und transgenen Hühnern erfolgte nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern unter der Nummer 55.2-1-54-2532-104-2015. Die Einzelhaltung von Hähnen zur Spermagewinnung wurde als Tierversuch unter der Nummer 55.2-1-54-2532.0-8-2015 bei der Regierung von Oberbayern angezeigt.

4.1.2 Bruteier

Für die Gewinnung primordialer Keimzellen (PGCs) wurden Bruteier verschiedener Hühnerlinien verwendet. Die Eier der Linie LSL-classic wurden von der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven bereitgestellt. Eier der Hühnerlinie CB wurden von Jirji Hejnar, *Institute of molecular genetics of the ASCR, Prague, Departement of viral and cellular genetics* zur Verfügung gestellt [150]. Eier der eGFP-Hühnerlinie 165-2 (Crystal Bioscience, Emeryville, USA) entstammten institutseigener Hühnerhaltung.

Zur Injektion von PGCs in Hamburger & Hamilton (H&H) Stadium 14-16 Embryonen wurden Embryonen der Hühnerlinie LSL-classic verwendet. Diese Bruteier stammten von der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven.

Bebrütung erfolgte am Institut für Tierphysiologie der LMU München unter Standardbedingungen: Bis zu Inkubationstag 17 wurden die Eier bei 37,8 °C und 55 % Luftfeuchte bebrütet, wobei sie täglich dreimal gewendet wurden. Ab Tag 18 wurde die

Wendeautomatik ausgeschaltet und die Temperatur auf 37,2 °C abgesenkt. Ab Inkubationstag 20 wurde die Luftfeuchtigkeit auf 80 % erhöht.

4.2 ZELLKULTUR

4.2.1 Medien und Zusätze

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Medien und Zusätze bei 4°C gelagert.

PGC Medium

462,25 ml Avian KO-DMEM²²

10 ml B27 Supplement²²

5 ml Glutamax²²

5 ml nicht essentielle Aminosäuren (*Non Essential Amino Acid Solution*)²²

5 ml Nukleotide 100 mM (EmbryoMAX® Nukleoside (100x))⁸

2 ml Sodium Pyruvate 100x²²

1 ml 2-Mercaptoethanol 50 mM²²

3,75 ml Calciumchlorid (CaCl₂) 20 mM⁷

5 ml Ovalbumin 20 %

1 g Ovalbumin²⁰

5 ml Avian KO-DMEM

1 ml Heparin Sulfat 50 mg/ml

0,25 g Heparin (*heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, TC grade*)²⁰

5 ml Avian KO-DMEM

Das PGC Medium wurde durch einen 2 µm Filter steril filtriert und anschließend in 50 ml Aliquots bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor Verwendung wurden pro 50 ml PGC Medium hinzugefügt:

100 µl Hühner Serum²², Lagerung bei -20 °C

25 µl h-Activin-A (25 ng/µl), Lagerung bei -80 °C

200 µl Ovalbumin 0,1 % (10 ml H₂O + 50 µl Ovalbumin 20 %)

5 µg Activin A (*human Activin A*)¹³, Lagerung bei -80 °C

20 µl h-fibroblast growth factor (FGF)2 (10 ng/µl), Lagerung bei -20 °C

25 µg bFGF (*recombinant human bFGF, from E. coli*)¹⁶, Lagerung bei -20 °C

2,5 ml 0,1 % Bovines Serum Albumin (BSA)-Lösung (50 mg *BSA Bovine Fraction V*²⁰ + 50 ml PBS)

Manipulation-Medium

500 ml CO₂ unabhängiges Medium (*CO₂ independent medium*)²²

56,8 ml fötales Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS)¹⁶, Lagerung bei -20 °C

5,7 ml Glutamax²², Lagerung bei -20 °C

Einfriermedium

80 % Manipulation-Medium

20 % DMSO (Dimethylsulfoxid, (CH₃)₂SO)², Lagerung bei Raumtemperatur

1:1 gemischt mit Manipulation-Medium zu einer Endkonzentration von 10 % DMSO

DT40 Medium

500 ml Basal Iscove Medium³

56 ml FBS¹⁶

5,5 ml Hühner Serum²²

1 ml 2-Mercaptoethanol²²

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

8,0 g Natriumchlorid (NaCl)²

1,45 g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na₂HPO₄·xH₂O)²

0,2 g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)²

0,2 g Kaliumchlorid (KCl)²

ad 1000 ml Aqua dest., Einstellung des pH-Werts auf 7,2 mit HCl oder NaOH. Vor Verwendung in der Zellkultur wurde die Lösung autoklaviert.

4.2.2 Gewinnung von PGCs aus Blut

Material

Bruteier

Manipulation-Medium

PGC Medium

Mikropipetten 40 µm¹⁰

DREMEL® 3000-15 Multifunktionswerkzeug⁹

DREMEL® Kombination Bohrständer und Werkzeughalter⁹

Donau Diamant Trennscheibe 22 mm⁹

Schlauch (0,125 cm innen, 0,25 cm außen)²²

Aspirator tube assemblies for calibrated microcapillary pipettes²⁰

Spritzenfilter 0,22 µm¹⁸

Tischinkubator (Flächenbrüter Modell 400)¹⁹

PGCs wurden aus dem Blut von H&H Stadium 14-16 Embryonen gewonnen. Hierfür erfolgte die Inkubation der Bruteier für etwa 65 h unter Standardbedingungen. Nach Anschleifen der Eischale mit einem Dremel® diente ein 38 °C warmer Tischinkubator dazu, die Eier warm zu halten. Die Eischale wurde vorsichtig mit Hilfe eines Skalpells geöffnet und der Embryo samt Eigelb und Eiklar in ein Wägeschälchen überführt. 1-2 µl Blut wurden mit Hilfe einer Mikropipette mit 40 µm Durchmesser und eines Mund-Injektions-Systems aus der Aorta dorsalis entnommen. Das entnommene Blut wurde anschließend in ein 0,5 ml Eppendorf Cup mit 100 µl 37 °C warmen PGC Medium überführt. Nach jedem Embryo wurde die Nadel mit Manipulation-Medium gespült.

Anschließend wurde das Medium von dem sich absetzenden Blutzell-Pellet möglichst vollständig abgenommen, die Blutzell-Pellets in je 300 µl bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibrierten PGC Medium resuspendiert und in sterile 48-Loch-Flachbodenplatten überführt. Es folgte eine tägliche Kontrolle der Zellen sowie bei Bedarf ein Wechsel des Mediums oder Passagierung der Zellen. Nach ungefähr 14 Tagen waren die andere Zellarten, vorwiegend Erythrozyten, abgestorben und eine reine PGC Kultur gewonnen. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter 4.2.7.1 beschrieben. Wie von Song et al. beschrieben galt eine PGC Linie nach Expansion auf 2×10^6 Zellen als etabliert [100]. PGC Linien, die bis zum Anwachsen auf diese Zellzahl über 50 Tage benötigten, wurden verworfen.

4.2.3 Gewinnung von PGCs aus Germinal Crescent

Material

Bruteier

PBS

Trypanblau²⁰

PGC Medium**DREMEL® 3000-15 Multifunktionswerkzeug⁹****DREMEL® Kombination Bohrständer und Werkzeughalter⁹****Donau Diamant Trennscheibe 22mm⁹****Tischinkubator (Flächenbrüter Modell 400)¹⁹**

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von PGCs ist die Präparation von Germinal Crescent von H&H Stadium 4-7 Embryonen. Hierfür erfolgte die Inkubation der Bruteier für 24-30 h unter Standardbedingungen. Die Eischale wurde mit einem Dremel® angeschliffen und die Eier anschließend in einem Tischinkubator warmgehalten. Der Inhalt der Eischale wurde vorsichtig in ein Wägeschälchen überführt und das Eiweiß weitestgehend abgeschüttet sowie zusätzlich der Dotter mit einem Papiertuch abgetupft. Zur Verbesserung der Sichtbarkeit wurde der Embryo mit Trypanblau unterspritzt. Anschließend wurde ein Ring aus Filterpapier auf dem Embryo platziert und um den Papierring herum der Embryo mit einer feinen Schere vom Eidotter abgelöst. Mit Hilfe einer feinen Pinzette wurde das Filterpapier mit dem Embryo angehoben und anschließend vorsichtig in einer Petrischale mit PBS gewaschen, um Dotterreste zu entfernen. Danach wurde der Embryo in eine weitere Petrischale mit PBS überführt. Während der Embryo mit einer feinen Kanüle fixiert wurde, konnte die Kopfregeion des Embryos mitsamt des Germinal Crescent abpräpariert und in ein 0,5 ml Eppendorf Cup mit 200 µl 37 °C warmen PGC Medium transferiert werden. Die darauffolgende Resuspendierung diente dem Aufbrechen des Gewebes. Anschließend wurden die gewonnenen Zellen in sterile 48-Loch-Flachbodenplatten überführt. Es folgte die tägliche Kontrolle der Zellen sowie Mediumwechsel oder Passagierung bei Bedarf. Das weitere Vorgehen entsprach dem bei der Gewinnung von PGCs aus embryonalem Blut (4.2.2).

4.2.4 Gewinnung von PGCs aus Gonaden**Material****Bruteier****PBS-BSA 0,1 %**

0,1 g BSA²
ad 100 ml PBS

Trypsin 0,25 %³**Manipulation-Medium**

PGC Medium

Aus Gonaden von H&H Stadium 28-30 Embryonen wurden PGCs, auch Gonozyten genannt, isoliert. Die Bruteier wurden für 6-7 Tage inkubiert, von jedem Embryo die Gonaden präpariert und in ein 1,5 ml Eppendorf Cup mit 400 µl PBS-BSA überführt. 100 µl einer 0,25 % Trypsinlösung wurden hinzugefügt. Nach Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten wurden 250 µl Manipulation-Medium hinzugegeben und die einzelnen Gonaden zerkleinert. Nach Zugabe weiterer 300 µl Manipulation-Medium folgte die Zentrifugation bei 400xg für fünf Minuten und Resuspendierung in 350 µl PGC Medium. Anschließend wurden die Zellen in sterile 24-Loch-Flachbodenplatten überführt. Etwa zwei Stunden später hatte sich der größte Anteil der somatischen Zellen abgesetzt. Die noch in Suspension befindlichen Gonozyten wurden vorsichtig ab pipettiert und in sterile 48-Loch-Flachbodenplatten mit je 300 µl PGC Medium umgesetzt. Es folgte die tägliche Kontrolle der Zellen sowie Mediumwechsel oder Passagierung bei Bedarf. Das weitere Vorgehen entsprach dem bei der Gewinnung von PGCs aus embryonalem Blut (4.2.2).

4.2.5 Einfrieren von Zellen

Die gewünschte Anzahl Zellen wurde zum Einfrieren als Einzelzellsuspension abzentrifugiert und in 0,9 ml 4 °C kalten Manipulation-Medium resuspendiert. 0,9 ml kaltes Einfriermedium (Manipulation-Medium mit 20 % DMSO) wurde tropfenweise unter Schwenken des Röhrchens hinzugegeben, sodass die finale DMSO-Konzentration 10 % betrug. Anschließend wurde das Gesamtvolumen von 1,8 ml in ein Gefrier Röhrchen überführt und in einer Cool Cell Einfrierbox²⁰ mit einer Kühlrate von -1 °C/min bei -80 °C eingefroren. Nach 12-72 h konnten die eingefrorenen Zellen zur Langzeitlagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff^l überführt werden.

4.2.6 Auftauen von Zellen

Das Gefrier Röhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurde unter Schwenken in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend sofort in ein 50 ml Zentrifugen Röhrchen überführt. Zur Verdrängung des zytotoxischen DMSO wurde 4 °C kaltes Manipulation-Medium tropfenweise unter Schwenken des Röhrchens zugegeben, bis ein Füllstand von etwa 10 ml erreicht war. Anschließend wurde das Zentrifugen Röhrchen mit kaltem Manipulation-Medium aufgefüllt und bei 225xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde

in einer der Zellzahl entsprechenden Menge Medium aufgenommen und in ein Kulturgefäß überführt.

4.2.7 Kultivierung von Zellen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Neben PGCs wurden DT40 Zellen (Avian Leukosis Virus induzierte Hyline SC Hühner Bursa-Lymphom Zelllinie [151]) verwendet.

4.2.7.1 Kultivierung von PGCs

PGCs wurden aus dem Zellkulturgefäß in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, vorsichtig resuspendiert und gezählt. Nach Zentrifugation (4 °C, 225xg, 10 min) wurden die Zellen auf eine Dichte von 125000 /ml eingestellt, wenn die nächste Versorgung innerhalb 48 h geplant war. Bei 72 h Abstand zur nächsten Versorgung der PGCs wurden die Zellen auf eine Dichte von 100000 /ml eingestellt. Dabei wurden zwei Drittel frisches PGC Medium und ein Drittel konditioniertes PGC Medium (Überstand nach Zentrifugation) verwendet.

4.2.7.2 Kultivierung von DT40 Zellen

Die in Suspension wachsenden DT40 Zellen wurden alle 48 bis 72 Stunden 1:10 geteilt.

4.3 ELEKTROPORATION VON ZELLEN

Material

Zellen

Nucleofector Solution V¹¹

Lagerung bei 4 °C

PBS

Elektroporationsküvetten mit 2 mm Elektrodenabstand¹¹

PGC Medium oder DT40 Medium

DNA

Durchführung

Zellen wurden elektroporiert, um sie mit Fremd-DNA zu transfizieren. Soweit nicht anders erwähnt, wurde ein ECM 830 Square Wave Electroporation System der Firma BTX (Holliston,

USA) verwendet. Daneben wurde ein Amaxa® Nucleofector® II Device (Lonza, Basel, Schweiz) eingesetzt.

4.3.1.1 Elektroporation von PGCs

Die Zellzahl für stabile Transfektionen betrug 5×10^6 Zellen, für transiente Transfektionen $3-5 \times 10^6$ Zellen. Die Zentrifugation der benötigten Zellmenge erfolgte bei 230xg für zehn Minuten. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in PBS resuspendiert und die Zellmenge für je eine Elektroporation in ein 1 ml Eppendorf Cup überführt. Nach erneuter Zentrifugation (300xg, 4 min) wurde der Überstand sorgfältig abgenommen. Die Zellen wurden mit der DNA und Nucleofector Solution V in einem Gesamtvolumen von 100 µl resuspendiert und anschließend in eine Elektroporationsküvette überführt. Die verwendeten Einstellungen für PGCs waren am ECM 830 Square Wave Electroporation System 8 Pulse, 350 V und 100 µsec. Am Amaxa® Nucleofector® II Device wurde Programm A-27 verwendet. Nach der Elektroporation wurden 500 µl 37 °C warmes PGC Medium zu den Zellen in die Elektroporationsküvette gegeben. Nach fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Resuspendierung der Zellen in der gewünschten Menge PGC Medium. Dieses setzte sich aus zwei Drittel frischem PGC Medium und einem Drittel konditioniertem PGC Medium zusammen.

Für eine stabile Transfektion wurde ein Gesamtvolumen von 24 ml PGC Medium zur Resuspendierung verwendet. Davon wurden je Delle 500 µl in eine sterile 48-Loch-Flachbodenplatte überführt. Dies erlaubte eine spätere klonale Expansion von Einzelzell-Klonen.

Für eine transiente Transfektion betrug das Endvolumen 5 ml. Die Zellen wurden in eine T75 Zellkultur-Flasche überführt.

4.3.1.2 Elektroporation von DT40 Zellen

Für stabile Transfektionen wurden 5×10^6 Zellen verwendet, für transiente Transfektionen $3-5 \times 10^6$ Zellen. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie unter 4.3.1.1 für PGCs beschrieben. Für stabile Transfektionen wurde ebenfalls Nucleofector Solution V verwendet. Für transiente Transfektionen wurde zur Resuspension von DNA und Zellen PBS verwendet. Die für DT40 Zellen verwendeten Einstellungen am Elektroporator waren 8 Pulse, 350 V und 125 µsec.

Nach der Elektroporation wurden die Zellen für eine stabile Transfektion in 10 ml DT40 Medium resuspendiert und in eine sterile 96-Loch-Flachbodenplatte überführt (100 µl pro Delle).

Für eine transiente Transfektion wurden die Zellen in 5 ml DT40 Medium aufgenommen und in eine T75 Zellkultur Flasche überführt.

4.3.1.3 Selektion von transfizierten Zellen

Material

Transfizierte Zellen

Puromycin 1 mg/ml

1 ml Puromycin Dihydrochlorid, 10 mg/ml²²
9 ml H₂O

Hygromycin B Lösung 41,2mg/ml²

PGC Medium

DT40 Medium

Durchführung

Kodiert die zur Transfektion verwendete DNA für eine Antibiotikaresistenz, so kann das entsprechende Antibiotikum zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen verwendet werden. Hierfür wurden die in Tabelle 1 gezeigten Konzentrationen verwendet. Die entsprechende Menge Antibiotikum wurde in der benötigten Menge Zellkultur Medium verdünnt und zu den Zellen gegeben, sodass am Ende im Zellkulturgefäß die gewünschte Konzentration erreicht wurde.

Sollten stabil transfizierte PGC-Klone selektiert werden, so begann die Selektion am Tag 5 nach Elektroporation. Nach zehntägiger Selektion, wobei die Hälfte des Mediums alle 48-72 Stunden gewechselt wurde, erfolgte das Screening auf Klone unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe 4.15). Positive Zellklone wurden in eine neue Platte umgesetzt und weiter versorgt. Nach weiteren 14 Tagen unter Selektion konnte die Antibiotikum-Menge auf 0,5x reduziert und über die folgenden 14 Tage ausgeschlichen werden.

Antibiotikum	Zelllinie	Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
Puromycin	DT40	0,5
	PGC	0,5
Hygromycin	DT40	2000
	PGC	50

Tabelle 1: Übersicht über die zur Selektion verwendeten Antibiotika

4.4 GEWINNUNG VON HAHNEN-SPERMA

Ab Beginn der Geschlechtsreife erfolgte die Einzelhaltung von Hähnen, von denen Sperma gewonnen werden sollte. Zur Gewöhnung an das Handling wurden die Tiere zwei bis dreimal wöchentlich auf einen Tisch gesetzt und an Berührungen am Rücken gewöhnt. Die Federn um die Kloake wurden mit einer Schere gekürzt, um eine bessere Übersicht zu gewährleisten und Verunreinigungen des Ejakulates zu verringern.

Die Spermagewinnung erfolgte durch manuelle Massagetechnik. Der Körper des Hahns wurde auf der Tischplatte platziert, während eine Person die Beine mit einer Hand fixierte und mit der zweiten Hand den Rücken des Hahns massierte. Eine zweite Person massierte die Abdominalregion ventral der Kloake durch vertikale Bewegungen. Sobald der Hahn die Schwanzfedern aufstellte und den medialen Phalluskörper ausstülpte, übte die zweite Person mit einer Hand Druck auf die Bereiche seitlich der Kloake aus und fing mit der zweiten Hand das Sperma in einem 1,5 ml Eppendorf Cup auf. Abbildung 9 zeigt die korrekte Position des Hahns auf dem Tisch sowie die Gewinnung des Spermas.

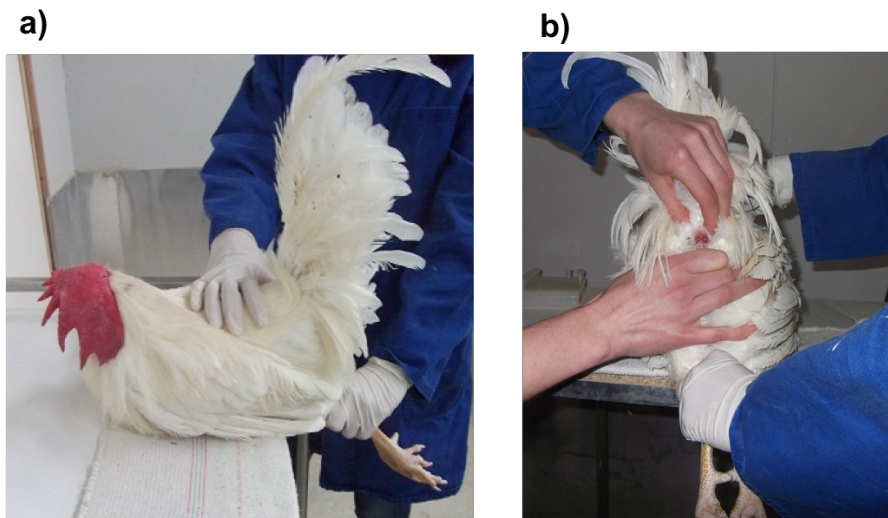


Abbildung 9: Spermagewinnung beim Hahn

a) Korrekte Position des Hahns auf dem Tisch und Massieren des Rückens. **b)** Bei Druck auf die Regionen seitlich der Kloake lässt sich Sperma in einem 1,5 ml Eppendorf Cup auffangen.

Das gewonnene Ejakulat wurde einer visuellen Kontrolle unterzogen. Hahnens-Sperma sollte weißlich und viskös sein. Unerwünscht sind Kontaminationen, zum Beispiel mit Fäzes und Blut oder wässrige Proben.

4.5 ISOLATION GENOMISCHER DNA

Genomische DNA wurde aus verschiedenen Zellen und Geweben isoliert.

4.5.1 Isolation genomischer DNA aus kultivierten Zellen

Für die Isolation genomischer DNA aus kultivierten Zellen wurde entweder das DNeasy Blood & Tissue Kit nach Herstellerangaben oder eine NaOH-Extraktionsmethode, modifiziert nach Wang et al. [152], verwendet.

4.5.1.1 Isolation mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit

Material

$2,5 \times 10^5$ bis 1×10^6 Zellen

DNeasy Blood & Tissue Kit¹⁵

Durchführung

Die Zellen wurden pelletiert und anschließend wurde die genomische DNA mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit nach Angaben des Herstellers für kultivierte Zellen isoliert. Nach

Konzentrationsbestimmung mithilfe des NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

4.5.1.2 Isolation mit der NaOH-Extraktionsmethode

Material

5x10⁵ bis 1x10⁶ Zellen

100 mM Natriumhydroxid (NaOH)

1 ml 1M NaOH²
ad 10 ml Aqua bidest.

75 mM Tris-HCl

91 mg Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)²
ad 10 ml Aqua bidest
Einstellung des pH-Werts auf 7,2 mit Chlorwasserstoff (HCl)

Durchführung

Die Pelletierung der Zellen erfolgte bei 400xg über einen Zeitraum von vier Minuten. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 30 µl 100 mM NaOH resuspendiert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation im Thermoblock bei 95 °C. Nach Zugabe von 100 µl 75 mM Tris-HCl wurde die Suspension mit Hilfe des Vortexers gemischt und über 30 Sekunden bei 13000xg zentrifugiert. Vom entstandenen Überstand konnte je eine Menge von 1-2 µl als Template in einer PCR-Reaktion eingesetzt werden.

4.5.2 Isolation genomischer DNA aus 6-7 Tage alten Hühnerembryonen

Um aus 6-7 Tage alten Hühnerembryonen genomische DNA zu isolieren, wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit nach Angaben des Herstellers unter Verwendung einer etwa erbsengroßen Gewebemenge angewendet.

Material

Hühnerembryo, 6-7 Tage alt

DNeasy Blood & Tissue Kit¹⁵

Durchführung

Das DNeasy Blood & Tissue Kit wurde nach Angaben des Herstellers für die Verwendung von Geweben angewendet. Nach Konzentrationsbestimmung mithilfe des NanoDropTM 1000 Spektrophotometers erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

4.5.3 Isolation genomischer DNA aus Hühnerblut

Für die Gewinnung genomischer DNA aus Hühnerblut wurde ein Pronase-Verdau verwendet [153].

Material

EDTA Blut

Lagerung bei -20 °C

STM Puffer

64 mM Sucrose²
20 mM Tris Cl, pH 7,5²
10 mM MgCl⁷
0,5 % Triton X-100²
Lagerung bei 4 °C

TEN Puffer

10 mM Tris-Cl, pH 8,0²
1 mM EDTA²
10 mM NaCl²
Lagerung bei Raumtemperatur

Pronase E 20 mg/ml

20 mg Pronase E²⁰
ad 1 ml H₂O
Lagerung bei -20 °C

Durchführung

Die Isolierung erfolgte je nach Probenanzahl in 96-Loch-Megablock-Platten oder in 1,5 ml Eppendorf Cups. 2 µl EDTA-Blut wurden in 200 µl STM Puffer gegeben. Nach Abzentrifugation der Nuklei bei 1000xg für fünf Minuten wurde der Überstand abgekippt. Um noch verbliebenen Überstand zu beseitigen wurde das Probengefäß auf Papiertüchern trocken geklopft. Dabei wurde für jedes Klopfen ein frisches Papiertuch verwendet um Kontaminationen zu vermeiden. Es folgte die Zugabe von 400 µl einer TEN Puffer-Pronase-Lösung. Hierfür wurde Pronase in einer Konzentration von 100 µg/ml in TEN Puffer gegeben. Die Megablock-Platte wurde mit Folie verschlossen und für ein bis zwei Stunden bei 37 °C und

250 rpm inkubiert. Darauf erfolgte die Inaktivierung für 20 Minuten bei 65 °C. Für eine PCR-Reaktion wurden 2 µl der so gewonnenen DNA als Probe verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

4.5.4 Isolation genomischer DNA aus Hahnen-Sperma

Für die Isolation genomischer DNA aus Hahnen-Sperma wurde ebenfalls ein Pronase-Verdau verwendet [153].

Material

Hahnen-Sperma

TEN Puffer

Pronase E 20 mg/ml

Durchführung

In einem 1,5 ml Eppendorf Cup wurden 5 µl Hahnen-Sperma zu 200 µl TEN Puffer mit 100 µg/ml Pronase gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C folgte die Inaktivierung bei 65 °C für zehn Minuten. Nach Bestimmung der Konzentration mithilfe des NanoDropTM 1000 Spektrophotometers konnten die Proben bei -20 °C gelagert werden.

4.6 POLYMERASE KETTENREAKTION

Unter Verwendung eines sequenzspezifischen Primerpaars kann bei einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase ein DNA-Segment vervielfältigt werden.

Standardmäßig wurde für PCR-Reaktionen der 5x FIREPol Master Mix verwendet. Zur Amplifikation längerer DNA-Segmente ab etwa 2000 bp diente die LongAmp Taq DNA Polymerase. Sollten die DNA-Segmente weiter für Klonierungen verwendet werden, so wurde für die PCR-Reaktion die Phusion HF Polymerase mit sogenannter *proof reading* Funktion verwendet.

4.6.1 PCR unter Verwendung des 5x FIREPol Master Mix

Material

5x FIREPol Master Mix²¹

Aqua bidest. (nukleasefrei)²

Primer

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics, Ebersberg. Die verwendeten Primer können Tabelle 6 entnommen werden.

Zielgen	Primer-	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Z-Chromosom	1	AAGCATAGAACAAATGTGGGAC	Geschlechtsbestimmung
Z-Chromosom	2	AACTCTGTCTGGAAGGACTT	
W-Chromosom	3	CTATGCCTACCACMTTCCTATTTGC	
W-Chromosom	4	AGCTGGAYTTCAGWSCATCTTCT	
mCherry	24	GCCACGAGTTCGAGATCGAG	Nachweis des mCherry-Gens
mCherry	25	AGATGAACTCGCCGTCCTGC	
mCherry	147	CAGGACGGCGAGTTCATCTACAAG	
mCherry	148	CAGCTTCAGCCTCTGCTTGATCTC	
eGFP	26	AAGGACGACGGCAACTACAAGACC	Nachweis des eGFP-Gens
eGFP	27	CTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTC	
Puromycin-Resistenz	133	CTGGTTTCTGGCCACTGTAGGAGTG	Nachweis des Puromycin-Resistenz-Gens
Puromycin-Resistenz	134	CGTGTCATACACCAGGTCCTAGGTC	
CAG Promoter	177	TTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC	Nachweis des CAG Promoters
CAG Promoter	178	GTCGTTGGGCGGTCAGC	
Cy Lokus	121	GCCATTCTATTCCCATCCTAAGT	Nachweis der Deletion des Cy-Gens
Cy Lokus	60	GTATCTAGCACAGAGAGCAGGAGAG	

Tabelle 2: Primer für PCR-Reaktionen mit dem 5x FIREPol Master Mix

Durchführung

Ansatz für eine PCR Reaktion

5x FIREPol Master Mix	4 µl
Primer sense (1 pmol/µl)	4 µl (final 0,2 µM)
Primer antisense (1 pmol/µl)	4 µl (final 0,2 µM)
DNA Probe	variabel
H ₂ O (nukleasefrei)	variabel
Gesamt	20 µl

Die gewählten Bedingungen für die PCR sind in Tabelle 3 aufgeführt. In der Regel wurden 35 Zyklen durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	1 bis 35
Annealing	primerspezifisch	30 sec	1 bis 35
Elongation	72 °C	1 min pro kb, je nach Länge des Amplifikats	1 bis 35
Finale Elongation	72 °C	10 min	35

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen für die 5x FIREPol Master Mix PCR

4.6.2 PCR unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Material

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase²²

5x Phusion Buffer HF²²

dNTP Mix (2 mM each)²²

Aqua bidest. (nukleasefrei)²

Primer

Die Synthese der Primer erfolge durch die Firma Eurofins Genomics, Ebersberg.

Die verwendeten Primer können Tabelle 4 entnommen werden.

Zielgen	Primer-Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Cy Lokus	30	GCAGAGCACAATGTCACTGGAAC	Klonierung und Sequenzierung Cy Lokus von genomischer DNA der CB Hühnerlinie
Cy Lokus	31	CACCCGAATAACTTCTGGGTAG	
Cy Lokus	32	CCCACATCCAGAGCACTTTG	
Cy Lokus	34	GTGCTGCTTGAGGAGAATCATG	
Cy Lokus	35	GTTGTCACTGTCACTGGCTG	
Cy Lokus	42	GAGTACAGCTCCACGCCATG	
Cy Lokus	43	GTGCTGCCTTGTGTGTCATG	
Cy Lokus	44	GTGGAAGAGCCAGAAGCTCTTG	
Cy Lokus	45	CACCTCCAACTTGTGGTACTAGG	
Cy Lokus	47	GCAACTCCACCAAATCAGGACTTG	
Cy Lokus	48	CACTCTGCTGCCTCATCAGTAAG	
Cy Lokus	49	GACCAGCTGTATCAACACAGGATC	
Cy Lokus	50	CTCCTCTGAACTGGTTGTGACTG	
Cy Lokus	53	CTCTCCCTTGAAGCTGAGTCAG	
Cy Lokus	54	GAACCCTGCCTATAAGCAGTGCTG	
Cy Lokus	55	GGTTCTGTCTGCTCAGAACCTGAG	
Cy Lokus	56	GATGGAGACCAGCCATATGATCTG	
Cy Lokus	57	GACACATGAGATGCTTAGGAGGAG	
Cy Lokus	59	CAGCTCCACGCCATGAAACCATAG	
Cy Lokus	60	GTATCTAGCACAGAGAGCAGGAGAG	
Cy Lokus	68	CATGTTCCAAAGGCAAGCAGACTC	
Cy Lokus	69	GGTAGAACCAGATCTGTGTGGTAC	
Cy Lokus	121	GCCATTCTATTCCCATCCTAAGT	Amplifikat für T7 Endonuklease Assay 5' CRISPR Cy-Gen
Cy Lokus	122	GCCATGACTGATGTCAGAGGGATTTA	

Zielgen	Primer-Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Cy Lokus	44	GTGGAAGAGCCAGAAGCTCTTG	Amplifikat für T7 Endonuklease Assay 3' CRISPR Cy-Gen
Cy Lokus	60	GTATCTAGCACAGAGAGCAGGAGAG	

Tabelle 4: Primer für PCR-Reaktionen mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Durchführung

Ansatz für eine PCR Reaktion

5x Phusion HF Buffer	10 µl
2 mM dNTPs	5 µl (final jeweils 200 µmol)
Primer sense (1 pmol/µl)	10 µl (final 0,2 µM)
Primer antisense (1 pmol/µl)	10 µl (final 0,2 µM)
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl (final 0,02 U/µl)
DNA Probe	variabel
H ₂ O (nukleasefrei)	variabel
Gesamt	50 µl

In Tabelle 5 sind die gewählten Bedingungen für die PCR aufgeführt. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	1
Denaturierung	98 °C	10 sec	1 bis 35
Annealing	primerspezifisch	30 sec	1 bis 35
Elongation	72 °C	15-30 sec pro kb, je nach Länge des Amplifikats	1 bis 35
Finale Elongation	72 °C	10 min	35

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase PCR

4.6.3 PCR unter Verwendung der LongAmp Taq DNA Polymerase

Material

LongAmp Taq DNA Polymerase¹²

5x LongAmp Taq Reaction Buffer¹²

dNTP Mix (10 mM each)²²

Aqua bidest. (nukleasefrei)²

Primer

Die Synthese der Primer erfolge durch die Firma Eurofins Genomics, Ebersberg.

Die verwendeten Primer können Tabelle 6 entnommen werden.

Zielgen	Primer-Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Cy Lokus	40	GCAGAGCACAATGTCACTGGAAC	Überprüfung der korrekten Integration von K32 und K73 in den Cy Lokus
HA Primer Pad	7	ATACGATGTTCCAGATTACGCTT	
Neomycin Resistenz	11	AGTGACAACGTCGAGCACAGCT	Überprüfung der korrekten Integration von K73 in den Cy Lokus
Cy Lokus	48	CACTCTGCTGCCTCATCAGTAAG	

Tabelle 6: Primer für PCR-Reaktionen mit der LongAmp Taq DNA Polymerase

Durchführung

Ansatz für eine PCR Reaktion

5x LongAmp Taq Reaction Buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0,75 µl (final jeweils 300 µM)
Primer sense (10 pmol/µl)	1 µl (final 0,4 µM)
Primer antisense (10 pmol/µl)	1 µl (final 0,4 µM)
LongAmp Taq DNA Polymerase	0,5 µl (final 0,1 U/µl)
DNA Probe	variabel
H ₂ O (nukleasefrei)	variabel
Gesamt	25 µl

In Tabelle 7 sind die gewählten Bedingungen für die PCR aufgeführt. Es wurden 30 Zyklen durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	94 °C	30 sec	1
Denaturierung	94 °C	30 sec	1 bis 30
Annealing	primerspezifisch	30 sec	1 bis 30
Elongation	65 °C	50 sec pro kb, je nach Länge des Amplifikats	1 bis 30
Finale Elongation	65 °C	10 min	30

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für die LongAmp Taq DNA Polymerase PCR

4.7 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe.

Material

Probe

Agarose²

5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)²
 27,5 g Borsäure²
 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8²
 ad 1000 ml Aqua dest.

1x TBE-Puffer

1:5 Verdünnung des 5x Stocks mit Aqua dest.

Orange G Loading Dye Buffer

60 ml Glycerol²
12 ml 0,5 M EDTA²
100 mg Orange G²
ad 100 ml Aqua bidest.

6x Orange G Loading Dye mit Gel Red (Ladepuffer)

990 µl Orange G Loading Dye Buffer
10 µl GelRedTM Nucleid Acid Stain (10.000x in water)⁴

1 Kb Plus DNA Ladder mit Gel Red (Marker)

4,5 µl 1 Kb Plus DNA Ladder²²
25 µl 6x Orange G Loading Dye mit Gel Red
120,5 µl Aqua bidest.

Durchführung

Die Agarose wurde in einer Konzentration von 1 % in 1x TBE-Puffer eingewogen und in einem Mikrowellenherd so lange erhitzt bis eine homogene, klare Flüssigkeit entstand. Dieses Agarosegel konnte anschließend in die Gießvorrichtung mit eingesetztem Probenkamm gegossen werden. Nachdem eine ausreichende Festigkeit des Agarosegels erreicht war, wurde es in die Elektrophoresekammer eingelegt und mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit dem Ladepuffer vermischt (fünf Teile Probe und ein Teil Ladepuffer) und in die Geltaschen pipettiert. In eine Tasche wurden 8 µl Marker pipettiert, um eine Vergleichsmöglichkeit für die Größe der erhaltenen Banden zu bekommen.

Es wurde eine konstante Spannung von 100 bis 130 V angelegt. Dies bringt die negativ geladenen DNA-Fragmente dazu sich im Gel in Richtung Kathode zu bewegen. Je nach Größe des Gels und der erwarteten Fragmentgröße wurde die Spannung nach 20-60 min gestoppt. Die Sichtbarmachung der aufgetrennten Fragmente erfolgte unter UV-Licht. Mit Hilfe des *Image Quant 300 Systems*, GE Healthcare, Garching konnte das Gel fotografiert werden.

4.8 DNA-AUFREINIGUNG AUS AGAROSEGELEN**Material****6x Kristallviolett Loading Dye (Ladepuffer)**

2 ml 0,5 M EDTA²
1 mg Kristallviolett²
3 ml Glycerol²
ad 10 ml Aqua bidest.

Kristallviolett-Lösung

2 mg Kristallviolett²
ad 100 ml Aqua bidest.

50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)²**1x TAE-Puffer**

1:50 Verdünnung des 50x Stocks mit Aqua dest.

E.Z.N.A® Ultra-Sep® Gel Extraction Kit²³

Um DNA-Fragmente nach PCR-Reaktionen oder Restriktionsenzym-Verdau aufzureinigen wurden die Proben 1:6 mit 6x Kristallviolett Loading Dye vermischt und in die Taschen eines 0,8 % Kristallviolett-TAE-Gels pipettiert. Zur Herstellung des Kristallviolett-TAE-Gels wurde Agarose in einer Konzentration von 0,8 % in 1x TAE-Puffer eingewogen und in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlung der homogenen Flüssigkeit auf etwa 50 °C folgte die Zugabe von 1 µl Kristallviolett-Lösung pro 1 ml Gel und die Vermischung durch Schwenken. Das Gel wurde in die Gießvorrichtung mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Bei Erreichen einer ausreichenden Festigkeit wurde das Gel in die Elektrophoresekammer verbracht und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Nach Durchführung einer Elektrophorese konnte die sichtbare Bande mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf Cup überführt werden.

Das Ultra-SepTM Gel Extraction Kit wurde zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen verwendet. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA erfolgte mithilfe des NanoDropTM 1000 Spektrophotometer. Bei Bedarf konnte die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

4.9 VERDAU VON PLASMIDEN DURCH RESTRIKTIONSENZYME

Material**Plasmid-DNA****Restriktions-Endonukleasen^{12,22}****Enzym-spezifische Reaktions-Puffer^{12,22}****Aqua bidest. (nukleasefrei)²**

Durchführung

Der Verdau durch Restriktionsenzyme diente dazu, DNA-Fragmente für Klonierungen herzustellen oder den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen. Das Programm *Lasergene SeqBuilder* (DNASTAR®, Madison, USA) wurde verwendet um geeignete Enzymschnittstellen in der Sequenz zu identifizieren. Alle Reaktionen wurden nach Herstellerangaben angesetzt. Der Erfolg des Verdaus wurde gelelektrophoretisch analysiert. Bei Bedarf wurden die gewünschten Fragmente aus einem Kristallviolett-TAE-Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

4.9.1.1 Linearisierung von C γ KO 1 und C γ KO 2

Material

Plasmid-DNA C γ KO 1 oder C γ KO 2

SgsI (10 U/ μ l)²²

10x Buffer Tango²²

Aqua bidest. (nukleasefrei)²

Durchführung

Zusätzlich wurden Restriktionsenzyme zur Linearisierung ringförmiger Plasmid-DNA eingesetzt. Zur Linearisierung von C γ KO 1 und C γ KO 2 wurde die in den Plasmiden einmalig vorkommende SgsI-Schnittstelle verwendet.

Ansatz für eine Reaktion

Plasmid-DNA C γ KO 1 oder C γ KO 2	100 μ g
SgsI (10 U/ μ l)	5 μ l
10x Buffer Tango	50 μ l
H ₂ O (nukleasefrei)	ad 500 μ l

Nach Inkubation bei 37 °C über fünf Stunden wurde die korrekte Linearisierung mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Nicht linearisiertes Plasmid diente dabei als Kontrolle. Bei erfolgreicher Linearisierung folgte anschließend die Aufkonzentrierung der DNA. Da bereits Buffer Tango im Reaktionsansatz enthalten war, wurde kein Buffer D zugefügt. Ansonsten erfolgte die Aufkonzentrierung wie bei 4.12.1 beschrieben.

4.10 VEKTOREN UND KLONIERUNG

In Tabelle 8 sind die für diese Arbeit verwendeten Vektoren, in Tabelle 9 die verwendeten Konstrukte zu sehen.

4.10.1 Verwendete Konstrukte

Laborinterne Konstrukte-Nr.	Vektor	Resistenz prokaryotisch/ eukaryotisch	Herkunft
K14	pBS 2BE attB 70	Ampicillin/Puromycin	Crystal Bioscience, Emeryville, USA
K15	pmCherry-N1	Kanamycin	Michael Lehmann, Institut für Virologie, Tierärztliche Fakultät der LMU München
K20	JH-KO CB eGFP-Puro attB70	Ampicillin/Puromycin	Benjamin Schusser, Professur für Biotechnologie der Reproduktion, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München
K34	PX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9	Ampicillin	Feng Zhang (Addgene plasmid # 42230)
K78	PX333	Ampicillin	Andrea Ventura (Addgene plasmid # 64073)
K79	pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0	Ampicillin/Puromycin	Feng Zhang (Addgene plasmid # 62988)
K90	pSBbi-RH	Ampicillin/Hygromycin	Eric Kowarz (Addgene plasmid # 60516)
K95	pSpCas9(BB)-p2A-Hygro	Ampicillin/Hygromycin	eigene Herstellung
K97	PX333-p2A-Hygro	Ampicillin/Hygromycin	eigene Herstellung

Tabelle 8: Verwendete Vektoren

Die Vektoren K95 und K97 wurden im Rahmen dieser Dissertation erstellt. Auf den Ablauf der Klonierung wird in den weiteren Punkten dieses Kapitels eingegangen.

Labor-interne Konstrukte-Nr.	Vektor	Insert	Ausgangskonstrukt	Klonierungs-Schnittstellen	Primer für Gibson Assembly
K16	pCMVSPORT-betaGal	phiC31 Integrase			
K17	Bluescript	mCherry	K155	HpaI/SalI	14/33
K22	Bluescript	long 5'HR yTZR CB positiv Kontrolle	K164	SgsI/NheI	64/69
K32	Bluescript	yTZR-KO CB eGFP-Puro attB70	K165	NotI/SpeI und SgsI/NheI	73/80 und 70/71
K59	PX330	sgRNA 1408	K184	BbSI	
K60	PX330	sgRNA 1409	K184	BbSI	
K61	PX330	sgRNA 1410	K184	BbSI	
K62	PX330	sgRNA 1411	K184	BbSI	
K63	PX330	sgRNA 1412	K184	BbSI	
K73	Bluescript	yTZR-KO CB eGFP-PURO attB70 repair CRISPR 1000bp	K164	NotI/SpeI und SgsI/NheI	73/200 und 201/73
K74	PX330	sgRNA 1403	K184	BbSI	
K83	PX459 V 2.0	sgRNA 1408	K230	BbSI	
K84	PX333	sgRNA 1403 und sgRNA 1410	K229	BbSI/BsaI	
K94	pSpCas9(BB)-p2A-Hygro	sgRNA 1408	K248	BbsI	

Tabelle 9: Verwendete Konstrukte

Alle in Tabelle 9 aufgeführten Konstrukte außer K16 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. K16 wurde von Michele Calos (Addgene Plasmid #18935) zur Verfügung gestellt. Auf den Ablauf der Klonierung wird in den weiteren Punkten des Kapitels näher eingegangen. Verwendete Primer und sgRNAs finden sich in den folgenden Abschnitten.

4.10.2 Gibson Assembly

Zur Klonierung des Vektors K97 sowie der Konstrukte K17, K22, K32 und K73 wurde die Gibson Assembly Klonierungsmethode verwendet. Bei dieser Methode können mehrere sich überlappende DNA-Stücke zusammengefügt werden. Dabei sind drei verschiedene enzymatische Reaktionen von Bedeutung:

Eine Exonuklease sorgt für einzelsträngige 3' Überhänge und ermöglicht somit das Zusammenlagern von Fragmenten mit komplementären (= überlappenden) Enden.

Eine Polymerase füllt die fehlenden Nukleotide zwischen den zusammengelagerten Fragmenten auf.

Noch vorhandene Einzelstrangbrüche können durch eine Ligase verbunden werden.

Die dafür verwendeten DNA-Fragmente können entweder über Restriktionsenzymverdau oder über PCR gewonnen werden.

Mit Hilfe des von New England Biolabs zur Verfügung gestellten Web-Tools NEBuilder™ (<http://nebbuilder.neb.com>) lassen sich Primer mit passendem Überhang, in der Regel 20-25 bp, entwerfen, mit denen sich die gewünschten Fragmente per PCR amplifizieren lassen.

Die Primer wurden mit Hilfe des Web-Tools NEBuilder™ entworfen und von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg synthetisiert. Tabelle 10 zeigt die hierfür verwendeten Primer.

Zielgen	Primer -Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
mCherry	14	TATCGCATGCCTGCGATGGTGAGCAAGGG CGAGG	Amplifikation des mCherry-Gens für K17
mCherry	33	AGCTGCAATAAACAAGTTCTACTTGTACA GCTCGTCCATGC	
Cy Lokus	73	GTTACCCCAGTTGGGGCACACACGTCCTAG TTTTGAAAAGGTTTATAAAATTG	Amplifikation 3' Homologie-Arm für K32
Cy Lokus	74	GTGGAGTTGCAATAAATCATTGAAAGGTAAA GAAAAG	
Cy Lokus	75	AATGATTTATTGCAACTCCACCAAATCAGG AC	
Cy Lokus	76	ACAGCTGGTCGGACCATTCTTTTGAGCCC	
Cy Lokus	77	GAAATGGTCCGACCAGCTGTATCAACACA G	
Cy Lokus	78	GGCAGGGTTCTTTGTTCAAAAAGCTTAAA AGG	
Cy Lokus	79	TTTGAACAAAGAACCCTGCCTATAAGCAG TG	
Cy Lokus	80	TGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCGG TTCTGTCTGCTCAGAACC	
Cy Lokus	70	TAGGGCGAATTGGGTACCGGCGCGCCAA CACTCTGATATGAGGAAAATC	Amplifikation 5' Homologie-Arm für K32
Cy Lokus	71	GTATGCTATACGAAGTTATGCTAGCGATTT GTTTTTGGGGGGG	
Cy Lokus	64	TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCAGAGCA CAATGTCACTGG	Amplifikation 5' Homologie-Arm für K22
Cy Lokus	65	TGGATGTGGGAGGTTGACAGTGTTGTTCT TTTAATAG	
Cy Lokus	66	CTGTCAACCTCCCACATCCAGAGCACTTG	

Zielgen	Primer -Nr.	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Cy Lokus	67	GTATGCTATACGAAGTTATGGATTTGTTTT TGGGGGGGAA	Amplifikation 5' Homologie-Arm für K22
Cy Lokus	201	TAGGGCGAATTGGGTACCGGCGCGCCTAT TTATTATTGTTATTTAATAATTGTCTATGG	Amplifikation 5' Homologie-Arm für K73
Cy Lokus	71	GTATGCTATACGAAGTTATGCTAGCGATTT GTTTTTGGGGGGG	
Cy Lokus	73	GTTACCCAGTTGGGGCACACACGTCCT AGTTTTGAAAAGGTTTATAAAATTG	Amplifikation 3' Homologie-Arm für K73
Cy Lokus	200	TGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCAA AAGAACGTTTGATGATTTTAATG	
p2A- Hygromycin- Resistenz	247	CCAGGCAAAAAAGAAAAAGGAATTCGGC AGTGGAGCTACTAACTTCAG	Amplifikation von p2A-Hygromycin- Resistenz für K95 und K97
p2A- Hygromycin- Resistenz	248	GCTGATCAGCGAGCTCTAGGAATTCCTATT CCTTTGCCCTCGGAC	

Tabelle 10: Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Gibson Assembly

Zur Durchführung der Gibson Assembly Reaktion wurde entweder das Gibson Assembly® Cloning Kit oder das NEBuilder® HIFI DNA Assembly Kit nach Herstellerangaben verwendet.

Material

Aufgereinigte DNA-Fragmente aus PCR oder Restriktionsenzym-Verdau

Aqua bidest. (nukleasefrei)²

Gibson Assembly® Cloning Kit¹² oder

NEBuilder® HIFI DNA Assembly Cloning Kit¹²

Durchführung

Die Verwendung des Gibson Assembly® Cloning Kits oder NEBuilder® HIFI DNA Assembly Cloning Kits erfolgte nach Herstellerangaben. 2 µl des Assembly-Produkts wurden anschließend zur Transformation in DH5 alpha Bakterien verwendet. Nach erfolgreicher Transformation wurde von vier bis sechs Kolonien Plasmid-DNA aufgereinigt und das erhaltene Plasmid mittels Restriktionsenzymverdau überprüft. Bei korrektem Ergebnis des Verdau wurde das Konstrukt durch die Firma GATC, Konstanz, sequenziert.

4.10.3 Klonierung von CRISPR/Cas9-Konstrukten

Material

CRISPR/Cas9-backbone-Vektor (K34, K78, K79, K95)

Oligonukleotide

Aqua bidest. (nukleasefrei)²

10x T4 Ligation Buffer¹²

T4 PNK¹²

10x FastDigest Buffer²²

FastDigest BbsI²²

FastDigest BsaI²²

Dithiotreitol (DTT) 10 mM²

Adenosintriphosphat (ATP) 10 mM²²

T7 DNA Ligase¹²

10x Plasmid Safe Buffer⁵

Plasmid Safe Exonuclease⁵

Durchführung

Geeignete sgRNA-Sequenzen wurden der Literatur entnommen oder mit Hilfe des von Zhang Lab @ MIT (Massachusetts Institute of Technology) zur Verfügung gestellten Online Tools CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu>) entworfen. Die Gestaltung der benötigten Oligonukleotide erfolgte für jede 20 bp lange sgRNA-Sequenz nach folgendem Schema:

5' – CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN – 3'

3' – CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAA – 5'

Begann die sgRNA-Sequenz nicht mit einem G, so wurde ein zusätzliches G eingefügt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg synthetisiert.

Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten sgRNA-Sequenzen.

Nummer	Zielgen	Sequenz
1403	Cy Exon 1	TGCATGATTCATAATTCTC
1411	Cy Exon 1	GGTGCTGAACTTCCTTTGTCTGGG
1412	Cy Exon 1	CCAAAAACAAATCCAGACAAAGG
1409	Cy Exon 3	ATTTATGTTTTCTTTCCCGAGGG
1410	Cy Exon 3	AGGACTGCAGCTAAGCCCTCGGG
1408	eGFP	GGGCACGGGCAGCTTGCCGG

Tabelle 11: Verwendete sgRNA-Sequenzen

Die Klonierung der sgRNAs in die CRISPR-backbone-Vektoren K34, K79 und K95 erfolgte nach dem von Zhang Lab (http://www.genome-engineering.org/crispr/?page_id=23) zur Verfügung gestellten Protokolls.

Der erste Schritt war die Phosphorylierung und das Annealing der Oligonukleotide.

Ansatz für eine Reaktion

Oligonukleotid 1 (100 µM)	1 µl
Oligonukleotid 2 (100 µM)	1 µl
10x T4 Ligation Buffer	1 µl
T4 PNK	0,5 µl
H ₂ O (nukleasefrei)	6,5 µl
Gesamt	10 µl

Das Annealing erfolgte im Thermocycler unter Verwendung der folgenden Parameter:

37 °C 30 min

95 °C 5 min, dann Abkühlung auf 25 °C in einer Geschwindigkeit von -5°C/min

Die zusammengefügte Oligonukleotide wurden 1:250 in nukleasefreiem Wasser verdünnt.

Anschließend folgte der zweite Schritt des Protokolls, die Verdau-Ligierungs-Reaktion. Hierbei wurde der CRISPR/Cas9-backbone-Vektor mit dem Restriktionsenzym *FastDigest BbsI* verdaut. Die zusammengefügte Oligonukleotide konnten dann durch die verwendeten Überhänge CACC beziehungsweise CAAA an der Schnittstelle eingefügt werden.

Ansatz für eine Reaktion

CRISPR/Cas9 backbone Vektor (100 ng)	variabel
1:250 verdünnte, zusammengefügte Oligonukleotide	2 µl
10x FastDigest Buffer	2 µl
FastDigest BbsI	1 µl
T7 DNA Ligase	0,5 µl
DTT 10 mM	1 µl
ATP 10 mM	1 µl
H ₂ O (nukleasefrei)	variabel
Gesamt	20 µl

Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler unter den folgenden Bedingungen inkubiert:

37 °C	5 min	Zyklus 1-6
23 °C	5 min	Zyklus 1-6

Im Anschluss wurde die Ligationsreaktion mit PlasmidSafe Exonuclease behandelt um unerwünschte Rekombinationsprodukte zu verhindern.

Ansatz für eine Reaktion

Ligationsreaktion	11 µl
10x PlasmidSafe Buffer	1,5 µl
ATP 10 mM	1,5 µl
PlasmidSafe Exonuclease	1 µl
Gesamt	15 µl

Die Inkubation erfolgte im Thermocycler bei 37 °C über 30 min. 2 µl des entstandenen Reaktionsproduktes wurden zur Transformation in DH5 alpha Bakterien verwendet.

In den CRISPR-backbone-Vektor K78 können zwei sgRNA-Sequenzen zur Koexpression kloniert werden. Das Einfügen der ersten sgRNA-Sequenz erfolgt nach dem gleichen Vorgehen wie bei der Klonierung in die Vektoren K34, K79 und K95. Die Klonierung der zweiten sgRNA-Sequenz erfolgt entsprechend, lediglich unter Verwendung des Restriktionsenzym FastDigest BsaI anstelle von FastDigest BbsI.

Nach erfolgreicher Transformation wurde von vier bis sechs Kolonien Plasmid-DNA aufgereinigt und das erhaltene Plasmid mittels Restriktionsenzymverdau überprüft. Bei korrektem Ergebnis des Verdaus wurde das Konstrukt durch die Firma GATC, Konstanz, sequenziert.

4.10.4 Amplifikation des TZR C γ -Gens und Klonierung mit dem TOPO® TA Cloning Kit®

Um das TZR C γ -Gen der CB Hühnerlinie zu amplifizieren und zu sequenzieren wurden mehrere 1-2 kb lange DNA-Stücke per PCR amplifiziert und diese Fragmente anschließend in den pCRTM 2.1 TOPO® Vektor kloniert und sequenziert. Als Template für diese PCR-Reaktionen diente genomische DNA von CB Hühnern. Für die PCR-Reaktionen wurde aufgrund ihrer *proofreading* Funktion die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Die PCR mit anschließender Gelelektrophorese und Aufreinigung aus einem Kristallviolett-Gel erfolgte wie unter 4.6.2, 4.7 und 4.8 beschrieben. Die verwendeten Primer können Tabelle 5 entnommen werden.

Der pCRTM 2.1 TOPO® Vektor liegt im Kit linearisiert vor und besitzt einzelsträngige 3'-Thymidin (T-) Überhänge. Topoisomerase I ist kovalent an den Vektor gebunden. Die Topoisomerase I schneidet einen Strang der DNA an der Schnittstelle 5'-CCCTT. Die dabei freiwerdende Energie wird gespeichert, indem Topoisomerase I kovalent an den 3'-Phosphat-Rest des geschnittenen DNA-Strangs bindet. Der pCRTM 2.1 TOPO® Vektor besitzt zwei dieser Schnittstellen. Dadurch werden nach Linearisierung durch die Topoisomerase I beide Schnittstellen durch das Enzym blockiert und somit eine Religation des Vektors verhindert.

Beim TOPO® TA Cloning können PCR Produkte mit Adenosin (A-) Überhängen an den T-Überhang des Vektors binden. Da die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase sogenannte *blunt ends* generiert, wurde der A-Überhang in Anschluss an die Aufreinigung des PCR-Produkts aus einem Gel mit Hilfe der Gotaq® DNA Polymerase angefügt.

Material

Aufgereinigtes PCR Produkt

Gotaq® DNA Polymerase¹⁴

5x Gotaq® Reaction Buffer¹⁴

dNTPs (10 mM each)²²

TOPO® TA Cloning Kit®²²

Aqua bidest. (nukleasefrei)²

Durchführung

Das Anfügen des A-Überhangs an das aufgereinigte PCR Produkt erfolgte nach folgendem Reaktionsansatz:

Ansatz für eine Reaktion

Aufgereinigtes PCR Produkt	19 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
Gotaq® DNA Polymerase	0,5 µl
5x Gotaq® Reaction Buffer	5 µl
Gesamt	25 µl

Die Inkubation im Thermocycler wurde nach den folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C	2 min
72 °C	10 min

Das TOPO® TA Cloning Kit wurde nach Herstellerangaben angewendet. 2 µl der erhaltenen Reaktion wurden zur Transformation in TOP10 Bakterien verwendet. Nach erfolgreicher Transformation wurde von vier bis sechs Kolonien Plasmid-DNA aufgereinigt und das erhaltene Plasmid mittels Restriktionsenzymverdau überprüft. Bei korrektem Ergebnis des Verdaus wurde das Konstrukt durch die Firma GATC, Konstanz, sequenziert. Das Alignment der erhaltenen Sequenzen erfolgte unter Verwendung des Programms *Lasergene SeqMan* (DNASTAR®, Madison, USA).

4.11 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Die Transformation von neu erstellten Plasmiden erfolgte unter Anwendung der in Tabelle 12 festgelegten Kriterien.

Bakterienstamm	Bakteriensubtyp	Inkubation auf Eis	Hitze-schock	SOC Medium	Inkubation bei 37 °C
E. coli	DH 5 alpha	30 min	30 sec	950 µl	250 rpm
E. coli	Top 10	30 min	30 sec	250 µl	200 rpm

Tabelle 12: Verwendete chemisch kompetente Bakterien

Material

Chemisch kompetente Bakterien

Lagerung bei -80 °C

*super optimal broth with catabolite repression-Medium (SOC Medium)*¹²

Lysogeny Broth (LB)-Ampicillin-Agar-Platten

Soweit nicht anders vermerkt wurde dem noch flüssigen Agar (Temperatur < 60 °C) Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

Durchführung

Nachdem die Bakterien fünf Minuten auf Eis aufgetaut waren, wurden 2 µl der Ligations-Reaktion aus Gibson Assembly, TOPO® TA Cloning, CRISPR-Klonierung oder 1 µg bis 100 ng der Plasmid-DNA zugegeben. Um die fragile Zellwand der chemisch kompetenten Bakterien nicht zu beschädigen, wurde die DNA durch sehr vorsichtiges Rühren untergemischt. Nach der Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C im Thermoblock. Direkt im Anschluss wurden die Bakterien für weitere zwei Minuten auf Eis gestellt. Dann wurde die benötigte Menge SOC Medium zugegeben und es folgte eine Inkubation im Bakterienschüttler bei 37 °C für eine Stunde. Anschließend wurden je 50 µl oder 100 µl der Bakteriensuspension auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Bei der Verwendung von DH 5 alpha Bakterien wurde, wenn nur wenige Kolonien erwartet wurden, eine dritte Platte mit den verbliebenen 800 µl bestrichen. Die LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.12 AUFREINIGUNG VON PLASMID-DNA

Nach Transformation wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Nach anschließender Überprüfung durch Restriktionsenzymverdau folgte die Sequenzierung durch die Firma GATC, Konstanz. Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurde das PureYield™ Plasmid Midiprep Kit oder das EndoFree Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben verwendet.

Material

PureYield™ Plasmid Miniprep System¹⁴

PureYield™ Plasmid Midiprep System¹⁴

EndoFree Plasmid Maxi Kit¹⁵

LB-Medium

25 g LB-Medium²
ad 1000 ml H₂O
Lagerung bei 4 °C

LB-Ampicillin-Medium

100 µg Ampicillin pro 1 ml LB Medium
Lagerung bei 4 °C

Durchführung

Zur Kultivierung der Bakterien für DNA-Isolierung wurde je eine Bakterienkolonie von der LB-Agarplatte mit einer Pipettenspitze in 4 ml LB-Ampicillin-Medium überführt, oder es wurden mit Hilfe einer Plastik-Impfschlinge Kristalle des entsprechenden Bakterienstocks abgekratzt und das LB-Ampicillin-Medium beimpft. Die Inkubation der Bakteriensuspension erfolgte über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Bakterienrüttler. Am nächsten Tag wurde Plasmid-DNA mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep System nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden entweder das PureYield™ Plasmid Midiprep System oder das EndoFree Plasmid Maxi Kit, ebenfalls nach Angaben der Hersteller, verwendet. Hierfür wurden für etwa acht Stunden 4 ml Bakteriensuspension bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Anschließend konnte die Kultur über Nacht in ein größeres Volumen LB-Ampicillin-Medium umgesetzt werden. Für das PureYield™ Plasmid Midiprep System und für das EndoFree Plasmid Maxi Kit wurden je 300 ml Medium verwendet.

Nach Messung der aufgereinigten DNA im NanoDropTM 1000 Spectrophotometer erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

4.12.1 Aufkonzentrierung von DNA

Für Elektroporationen wurde Plasmid-DNA in einer Konzentration von mindestens 1000 ng/μl eingesetzt. Wurde bei der Aufreinigung keine ausreichende Konzentration erreicht oder musste das Plasmid durch Restriktionsenzymverdau linearisiert werden, wurde, um eine höhere Konzentration zu erreichen, die DNA präzipitiert und anschließend in einem geringeren Volumen gelöst.

Material

Ethanol absolut für Molekularbiologie²

Ethanol 70 %

35 ml Ethanol absolut für Molekularbiologie

15 ml Aqua bidest

Buffer D¹⁴

PBS

Plasmid-DNA

Durchführung

Die gewünschte Menge Plasmid-DNA mit zusätzlichen 25 % für mögliche Verluste wurden mit dem zweifachen Volumen Ethanol absolut und 1x Buffer D vermischt. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 15000xg hatte sich die ausgefallene DNA in Form eines weißlichen Präzipitats abgesetzt. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA zweimal in je 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und für je fünf Minuten bei 15000xg abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das DNA-Pellet etwa 20 Minuten an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend folgte die Resuspendierung in der errechneten Menge 50 °C warmen PBS. Der Erfolg der Aufkonzentrierung wurde durch Messung im NanoDropTM 1000 Spectrophotometer überprüft.

4.13 T7 ENDONUKLEASE ASSAY

Der T7 Endonuklease Assay wurde zum Nachweis von Fehlpaarungen in der DNA-Sequenz, wie sie nach Cas9-induziertem Doppelstrangbruch und anschließendem *non-homologous end joining* entstehen können, verwendet. Das Enzym T7 Endonuklease I erkennt und schneidet

fehlgepaarte Basenpaare in der DNA. Beim T7 Endonuklease Assay werden etwa 1 kb große PCR-Amplifikate von genomischer DNA von Zellen, die beispielsweise mit Cas9 behandelt wurden, auf eben solche Fehlpaarungen untersucht. Bei positivem Ergebnis zeigen sich zusätzliche Banden in der Gelelektrophorese. Die Primer sollten dabei so gestaltet werden, dass die voraussichtliche Mutationsstelle nicht in der Mitte des PCR-Amplifikates liegt, sodass die Produkte des T7 Endonuklease Verdau leicht erkannt werden können. Um zu verhindern, dass Fehlpaarungen durch die Polymerase eingefügt werden, wurde für die PCR-Reaktionen die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase mit *proof reading* Funktion eingesetzt.

Material

Aufgereinigtes PCR-Produkt

10x NEB Buffer 2¹²

Aqua bidest. (nukleasefrei)²

T7 Endonuklease I¹²

25 M EDTA²²

Durchführung

Der erste Schritt diente dem Zusammenfügen der einzelsträngigen PCR-Amplifikate.

Ansatz für eine Reaktion

Aufgereinigtes PCR Produkt	800 ng
10x NEB Buffer 2	2 µl
H ₂ O (nukleasefrei)	variabel
Gesamt	19 µl

Es folgte die Inkubation im Thermocycler unter den folgenden Bedingungen:

95 °C	5 min
95-85 °C	Abkühlung um -2 °C/sec
85-25 °C	Abkühlung um -0,1 °C/sec

Als nächstes wurde 1 µl T7 Endonuklease I hinzugefügt und die Reaktion für 15 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Der Verdau wurde durch 1,5 µl 25M EDTA gestoppt. 10 µl des finalen Produktes wurden auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt.

4.14 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

Durchflusszytometrische Untersuchungen wurden am FACS CantoII (BD, Heidelberg) durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm *FlowJo 10.0.8*, FlowJo LLC (Ashland, USA) verwendet.

Material

Fluo-Puffer

5 g BSA²
50 mg Natrium Azid (NaN₃)²
ad 500 ml PBS pH 7,2
Lagerung bei 4°C

PBS

Zellen

Durchführung

Die Zellen wurden in einer 96-Rundlochplatte in einer Dichte von 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen/Delle ausgesät. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 700xg wurde der Überstand abgekippt. Um die Zellen zu waschen, wurden sie in 200 µl Fluo-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 400 µl Fluo-Puffer resuspendiert und in ein Messröhrchen überführt. Daraufhin konnte die Messung am FACS CantoII durchgeführt werden.

4.15 UNTERSUCHUNGEN AM FLUORESZENZMIKROSKOP

Das Fluoreszenzmikroskop diente zur Untersuchung von Zellen auf die fluoreszierenden Proteine eGFP und mCherry. Es wurde ein Leica DMIL Mikroskop (Leica, Bensheim) mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern (eGFP: BP 546, FT 580, LP 590; mCherry: BP 470/20, FT 493, BP 505/530) verwendet. Die Bilder der untersuchten Gonaden wurden mit einer DFC340FX Kamera in vierfacher Vergrößerung aufgenommen. Es wurde die Software *Leica Application Suite V.4.5.0* (Leica, Bensheim) verwendet.

4.16 UNTERSUCHUNG VON EMBRYONEN UND KÜKEN AUF DIE EXPRESSION FLUORESZIERENDER PROTEINE

Um festzustellen, ob sechs bis sieben Tage alte Hühnerembryonen eGFP oder mCherry exprimieren, wurden die Eier geöffnet und die Embryonen in Wägeschälchen verbracht. In

einem dunklen Raum wurden die Embryonen auf Expression der fluoreszierenden Proteine untersucht. Zur Untersuchung auf mCherry fand eine Lampe mit einer Anregungs-Wellenlänge von 576-588 nm (FS/ULS S-02 G2) und ein Emissionsfilter mit 590 bis 660 nm (FS/TEF-4R2) Verwendung. Die Lichtquelle und der Filter wurden hierfür an einem *Miner's Lamp* Rahmen (FHS/T01) befestigt. Diese Utensilien wurden von der Firma BLS® (Budapest, Ungarn) hergestellt.

Zur Untersuchung auf eGFP wurde eine Maxx 5 Lampe (Maxenon, Aalen) mit blauem LED-Licht als Anregungs-Lichtquelle sowie Dark Reader® *Viewing Glasses* (MoBiTec GmbH, Göttingen) als Filter verwendet.

Küken wurden ebenfalls in einem dunklen Raum mit den angegebenen Materialien untersucht.

4.17 GENERIERUNG VON KEIMBAHN-CHIMÄREN

Zur Generierung von Keimbahn-Chimären wurden genetisch veränderte PGCs in 65 h alte Hühnerembryonen injiziert. Diese wurden anschließend in Ersatz-Eischalen transferiert und weiter bebrütet.

Material

PGCs

Manipulation-Medium

LSL-classic Bruteier

Puteneier⁶

Eiklar

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100 µg/ml)³

Mikropipetten 40 µm¹⁰

DREMEL® 3000-15 Multifunktionswerkzeug⁹

DREMEL® Kombination Bohrständer und Werkzeughalter⁹

Donau Diamant Trennscheibe 22mm⁹

Schlauch (0,125 cm innen, 0,25 cm außen)²²

Aspirations-Schlauch-Sets für Mikrokapillaren (*Aspirator tube assemblies for calibrated microcapillary pipettes*)²⁰

Spritzenfilter 0,22 µm¹⁸

Tischinkubator (Flächenbrüter Modell 400)¹⁹

Frischhaltefolie SaranTM Cling Plus¹⁷

4.17.1 Injektion von PGCs in H&H Stadium 14-16 Embryonen

LSL-classic Bruteier wurden gewogen und anschließend für etwa 65 h unter Standardbedingungen bebrütet. Am Tag der Injektion wurde die Eischale vorsichtig mit dem DREMEL® und einer Diamanttrennscheibe entlang des Ei-Äquators angeschliffen, um eine Sollbruchstelle zu schaffen. Bis zur Injektion wurden die Eier in einem 38 °C warmen Tischinkubator warmgehalten.

PGCs wurden jeweils etwa eine Woche vor Injektion in Kultur genommen. Am Tag der Injektion wurden die Zellen gezählt, abzentrifugiert und in Manipulation-Medium auf eine Dichte von 3000 Zellen/µl eingestellt.

Die Bruteier wurden vorsichtig mit Hilfe eines Skalpellts geöffnet (Abbildung 10 a), b)) und der Embryo mitsamt Dotter und Eiklar in ein Wägeschälchen überführt. Nur Embryonen mit intaktem Dotter konnten für Injektion und Transfer verwendet werden (Abbildung 10 c), d)). Die Injektionen wurden mit einer 40 µm Mikropipette aus Glas und einem Mund-Injektions-System durchgeführt. Zur Verhinderung von Kontaminationen befand sich zwischen Mikropipette und Mundstück ein Spritzenfilter. Unter einem Leica M165 FC Stereomikroskop (Leica, Bensheim) wurden je 1 µl Zellsuspension in das Gefäßsystem jedes Embryos injiziert. Nach jedem Embryo wurde die Mikropipette in steril-filtrierte Manipulation-Medium gespült.

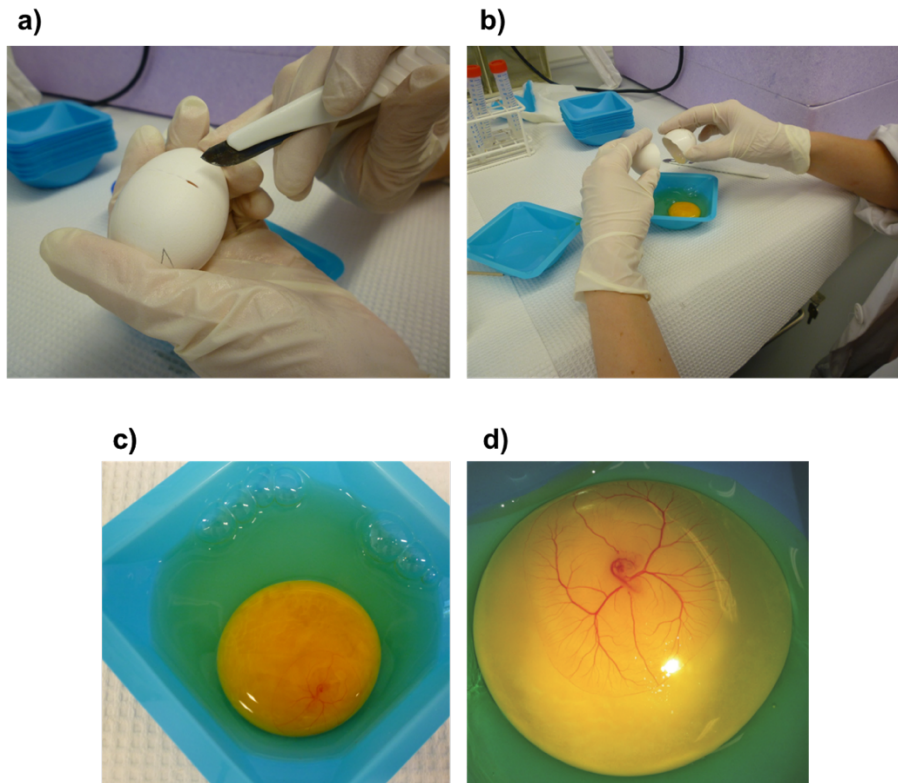


Abbildung 10: Injektion von PGCs in H&H Stadium 14-16 LSL Embryonen

a), b) Nach Anschleifen der Eischale mit dem DREMEL® wurde das Ei vorsichtig mit einem Skalpell geöffnet und in ein Wägeschälchen überführt. **c), d)** 65 h alter Embryo mit intaktem Dotter in einem Wägeschälchen.

4.17.2 Transfer in Ersatz-Eischalen

Die Puteneier wurden gewogen und bei 4 °C bis zum Injektionstag gelagert. Am Injektionstag wurden der spitze Pol der Puteneier mit dem DREMEL® abgetrennt (Abbildung 11 a)). Der Eiinhalt wurde entleert und die Eischalen auf einer saugfähigen Unterlage getrocknet (Abbildung 11 b)).

In jede entleerte Puteneischale wurden 1 ml Penicillin-Streptomycin Lösung gegeben. Injizierte Embryonen konnten mit Hilfe einer Plastikrutsche in die entleerten Puteneischalen überführt werden (Abbildung 11 c)). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Ersatz-Eischale von einem Putenei stammte, welches 30-40 g schwerer war als das Ei, aus dem der Embryo stammte. Nach einer Kontrolle, ob Eidotter und Embryo unversehrt geblieben waren, wurde die Ersatz-Eischale mit Klarsichtfolie und Eiklar verschlossen (Abbildung 11 d) e) f)). Die weitere Bebrütung der Eier erfolgte in einem 35°-Kipp-Inkubator. Eine tägliche Kontrolle diente der Entfernung abgestorbener Embryonen. Am Inkubationstag 21 erfolgte der assistierte Schlupf. Hierfür wurden die Eier einzeln in Boxen aus Karton verbracht und damit eine individuelle Zuordnung der geschlüpften Küken ermöglicht (Abbildung 12).

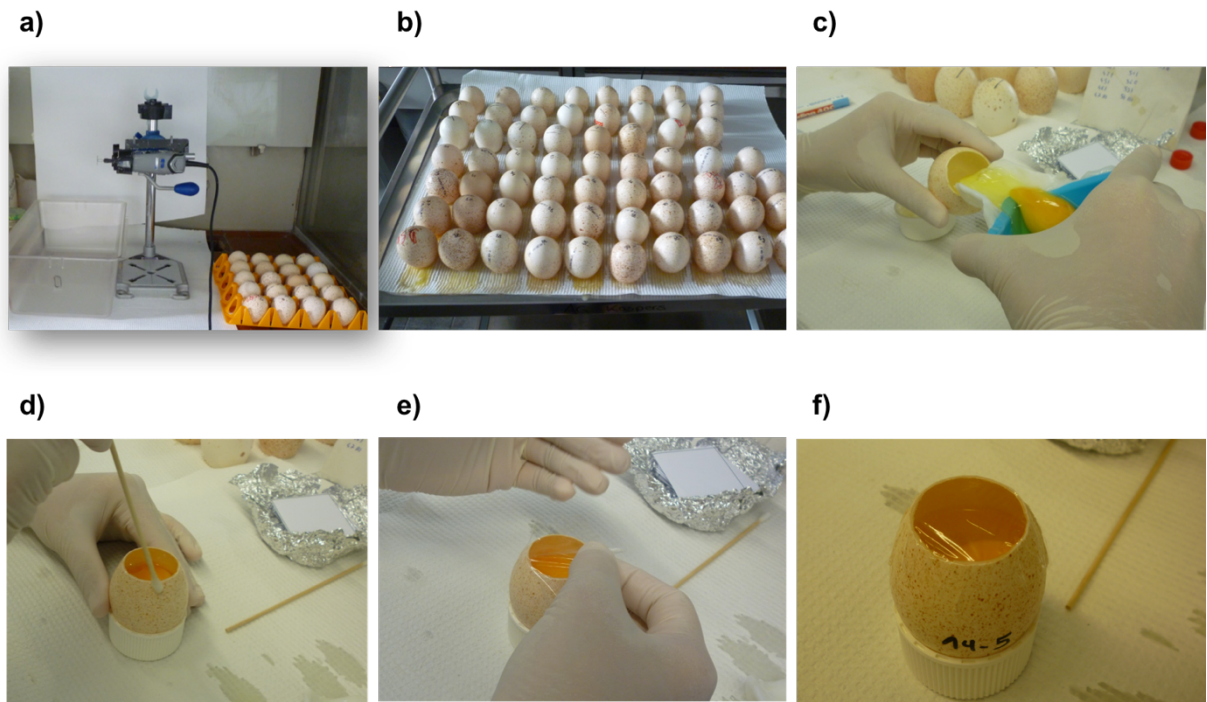


Abbildung 11: Transfer und Bebrütung von Hühnerembryonen in Puteneischalen

a) Puteneier wurden mit dem DREMEL® eröffnet und entleert. b) Trocknen der entleerten Puteneischalen auf einer saugfähigen Unterlage c) Injizierte Embryonen wurden vorsichtig in entleerte Puteneischalen überführt. d), e), f) Verschließen der Ersatz-Eischalen mit Eiklar und Klarsichtfolie.



Abbildung 12: Schlupf der Küken aus Ersatz-Eischalen in individuellen Boxen

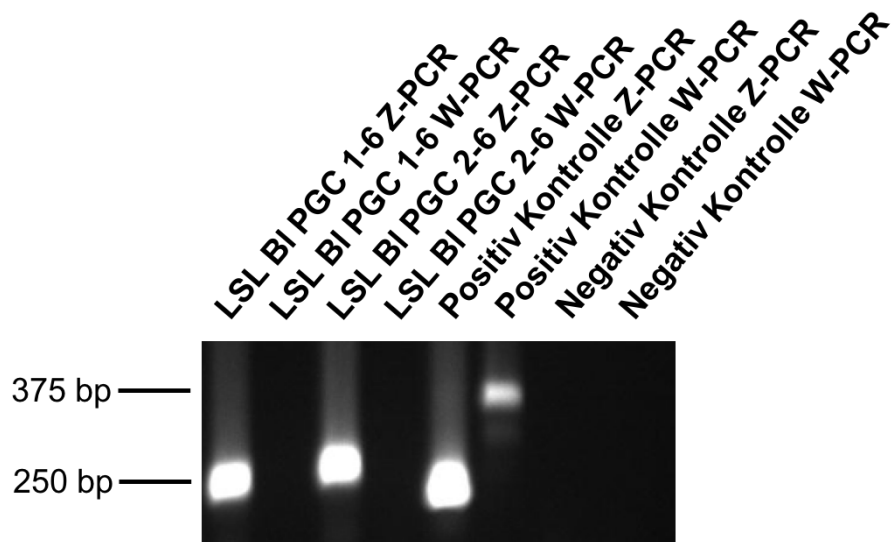
5. ERGEBNISSE

5.1 GEWINNUNG VON PGC LINIEN

Um transgene Hühnerlinien mit Inzuchthintergrund zu generieren, wurden PGCs von Embryonen der CB Hühnerlinie gewonnen. Da die gewonnen CB PGCs klumpig und langsam wuchsen und schlechte Keimbahn-Transmission zeigten, wurden später Versuche mit LSL PGCs durchgeführt. Bei der LSL-classic Hühnerlinie handelt es sich um eine kommerzielle Legelinie auf Auszuchthintergrund mit hoher Fruchtbarkeit und Legeleistung. eGFP-positive PGCs konnten aus Embryonen der eGFP Hühnerlinie 165-2 gewonnen werden. PGCs der Inzucht Hühnerlinie CB und der eGFP Hühnerlinie wurden aus Germinal Crescent isoliert. PGCs der LSL-classic und eGFP Hühnerlinien wurden aus Blut gewonnen. Des Weiteren wurden PGCs der LSL-classic Hühnerlinie aus Gonaden gewonnen. Zwei Wochen nach Beginn der Kultur zeigten sich PGCs in bis zu der Hälfte der angesetzten Dellen. Die Zellen wurden weiter versorgt, indem nach Bedarf das Medium gewechselt oder die Zellen in ein großflächigeres Zellkulturgefäß umgesetzt wurden. Bei Erreichen einer ausreichenden Zellzahl (in der Regel etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen) wurden 250000-500000 Zellen verwendet, um genomische DNA zu isolieren und das Geschlecht der jeweiligen PGC Linie per PCR mit W- und Z-Chromosom spezifischen Primern zu ermitteln. Abbildung 13 zeigt diese PCR für zwei männliche PGC Linien. Männliche Zellen sind für das Z-Chromosom positiv und für das W-Chromosom negativ. Weibliche Zellen sind sowohl für W- als auch Z-Chromosom positiv. Als Kontrolle wurde genomische DNA eines weiblichen Huhns eingesetzt.

Mindestens 1×10^6 Zellen jeder PGC Linie wurden eingefroren. Bei Bedarf wurden männliche PGCs für Transfektionen expandiert.

Tabelle 13 zeigt die erstellten PGC Linien sowie deren Geschlecht und die Dauer der Kultivierung bis zum Einfrieren.

**Abbildung 13: PCR zur Geschlechtsbestimmung von PGC Linien**

PCR zur Geschlechtsbestimmung für zwei aus Blut gewonnene männliche LSL PGC Linien. Männliche Zellen sind positiv für das Z-Chromosom und negativ für das W-Chromosom. Weibliche Zellen sind sowohl für Z- als auch W-Chromosom positiv. Als positiv Kontrolle wurde genomische DNA eines weiblichen Huhns verwendet. Die erwartete Bandengröße lag für die W-PCR bei 375 bp, für die Z-PCR bei 250 bp.

Hühnerlinie	Isoliert aus	Bezeichnung	Geschlecht	Kulturdauer zum Zeitpunkt des Einfrierens in Tagen
CB	Germinal Crescent	1	weiblich	39
CB	Germinal Crescent	3	weiblich	39
CB	Germinal Crescent	5	männlich	49
CB	Germinal Crescent	7	weiblich	39
CB	Germinal Crescent	11	männlich	45
CB	Germinal Crescent	12	männlich	45
eGFP	Germinal Crescent	27	männlich	30
eGFP	Germinal Crescent	54	männlich	30
LSL	Gonaden	10	männlich	32
LSL	Gonaden	11	männlich	32
LSL	Gonaden	14	männlich	29
LSL	Gonaden	29	männlich	29
LSL	Gonaden	33	weiblich	32
LSL	Blut	3-2	männlich	25
LSL	Blut	3-4	männlich	25
LSL	Blut	1-7	männlich	34
LSL	Blut	2-7	männlich	34
LSL	Blut	2-6	männlich	36
eGFP	Blut	1-1	weiblich	34
eGFP	Blut	2-3	weiblich	34
eGFP	Blut	1-4	männlich	39

Tabelle 13: Übersicht über die erstellten PGC Linien

Bei Erreichen einer Zellzahl von wenigstens 1×10^6 wurden die PGCs eingefroren.

5.2 GENERIERUNG VON TRANSGENEN HÜHNERN MIT UBIQUITÄRER mCHERRY EXPRESSION

Es wurde an der Erstellung einer transgenen Hühnerlinie mit ubiquitärer mCherry Expression gearbeitet. Diese Hühnerlinie wird später für verschiedene Experimente wie beispielsweise

Versuche mit adoptiven Transfers genutzt. Außerdem diente die Arbeit an dieser Hühnerlinie der Etablierung der für die Generierung transgener Hühner benötigten Methoden.

5.2.1 Klonierung eines mCherry-attB Konstrukts

Ein Plasmid wurde kloniert um das mCherry-Gen in das Hühnergenom einzufügen. Das mCherry-Gen wird unter einem Hühner- β -Aktin-Promoter exprimiert. Ein Puromycin-Resistenz-Gen unter einem CAG-Promoter erlaubt die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen. Diese selektierbare Markerkassette wird von HS4-Insulatoren flankiert. Eine attB-Rekombinationsstelle fördert sequenzspezifische Rekombination mit pseudo-attP-Rekombinationsstellen im Hühnergenom. Für diese sequenzspezifische Rekombination wird das Konstrukt mit einem phiC31 Integrase Konstrukt kotransfiziert. Per Sequenzierung wurde die Korrektheit des Konstrukts bestätigt. In Abbildung 14 ist ein Schema des Konstrukts zu sehen.

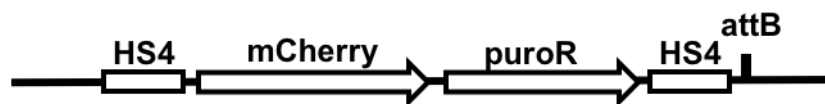


Abbildung 14: Schema des mCherry-attB Konstrukts

Die selektierbare Markerkassette besteht aus β -Aktin-mCherry und CAG-Puro, flankiert von HS4-Insulator Elementen. Die attB-Rekombinationsstelle dient der sequenzspezifischen Rekombination bei Verwendung von phiC31 Integrase.

5.2.2 Erstellung mCherry-positiver CB PGCs

Um mCherry-positive CB PGC Linien zu erhalten, wurden 5×10^6 CB PGCs mit je 10 μg mCherry-attB und 10 μg phiC31 Integrase Konstrukt elektroporiert. Die Zellen wurden auf 48-Loch-Flachbodenplatten transferiert, um eine klonale Expansion erfolgreich transfizierter Zellen zu ermöglichen. Die Selektion mit Puromycin begann fünf Tage nach Transfektion. Nach Selektion über zehn Tage wurde mikroskopisch nach mCherry-positiven, lebenden Zellen gesucht. Positive Zellklone wurden expandiert. Die Effizienz lag bei vier Klonen in 5×10^6 Zellen. Zusätzlich wurden die Zellen per Durchflusszytometrie auf Expression von mCherry untersucht. Dies ist am Beispiel der Zelllinie CB PGC mCherry 1B2 in Abbildung 15 zu sehen. Während die untransfizierten CB PGCs mCherry-negativ waren, waren die Zellen des Klons CB PGC mCherry 1B2 zu 99,9 % mCherry-positiv. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

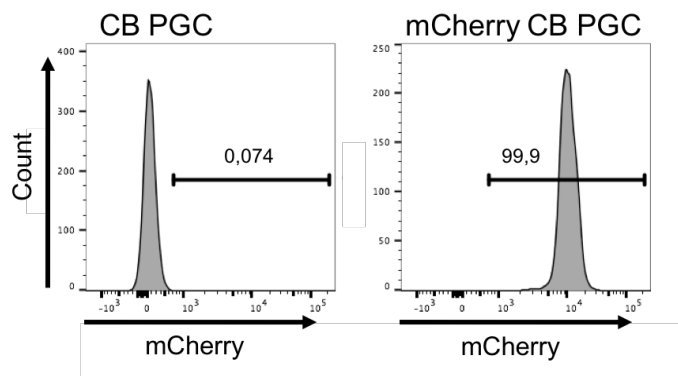


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse von PGCs auf mCherry Expression

Die Zelllinie CB PGC mCherry 1B2 wurde durchflusszytometrisch auf mCherry Expression untersucht.

5.2.3 Generierung von Keimbahn-Chimären mit CB PGC mCherry Linien

Die Injektion von zwei der erstellten CB PGC mCherry Linien in Embryonen diente der Generierung von Keimbahn-Chimären. Eine Woche vor Injektion wurden die Zellen in Kultur genommen und am Tag der Injektion in Manipulation-Medium in einer Dichte von 3000 Zellen/ μ l aufgenommen.

Das Vorgehen entsprach dem unter 4.17 beschriebenen. Zur Injektion wurden 65 h alte LSL-classic Embryonen verwendet. Es wurden 3000 mCherry CB PGCs in einem Volumen von 1 μ l in das Gefäßsystem jedes Embryos injiziert. Anschließend wurden die Embryonen in entleerte Puteneischalen transferiert. Diese wurden mit Frischhaltefolie verschlossen und weiter bebrütet. Der Schlupf erfolgte regulär an Inkubationstag 21, wobei die Küken während des Schlupfvorgangs spätestens alle vier Stunden kontrolliert wurden. Falls nötig, wurde Schlupfhilfe geleistet. Tabelle 14 zeigt die verwendeten Zelllinien, die Anzahl der erfolgreich injizierten und transferierten Embryonen sowie die nachfolgend geschlüpften und aufgezogenen Chimären.

Zelllinie	Injizierte und transferierte Embryonen	Geschlüpfte Chimären (♂ und ♀)	Aufgezogene Keimbahn-Chimären (♂)
CB PGC mCherry 1B2	102	37	19
CB PGC mCherry 1E2	35	4	3

Tabelle 14: Übersicht über die Injektionen von mCherry CB PGC Linien in LSL-classic Embryonen

Von den geschlüpften Chimären wurde Blut entnommen und daraus genomische DNA isoliert. Diese wurde verwendet, um per PCR mit W- und Z-Chromosom spezifischen Primern das Geschlecht festzustellen. 19 männliche Chimären der Linie CB PGC mCherry 1B2 und drei männliche Chimären der Linie CB PGC mCherry 1E2 wurden aufgezogen. Weibliche Chimären wurden im Alter von etwa fünf Tagen euthanasiert. Um die Gonaden mikroskopisch auf Kolonisation durch mCherry CB PGCs untersuchen zu können, wurden die Gonaden von beim Schlupf verstorbenen Küken oder von euthanasierten weiblichen Küken untersucht. Es wurden die Gonaden von 16 CB PGC mCherry 1B2 Chimären und einer CB PGC mCherry 1E2 Chimäre untersucht. Die Effizienz der Kolonisation wurde geschätzt. Beide injizierte mCherry CB PGC Linien waren in der Lage die Gonaden zu besiedeln. Die Effizienz der Kolonisation lag zwischen 0 % und 15 %. Abbildung 16 zeigt beispielhaft die Bilder der Gonaden dreier weiblicher Keimbahn-Chimären der Linie CB PGC mCherry 1B2.

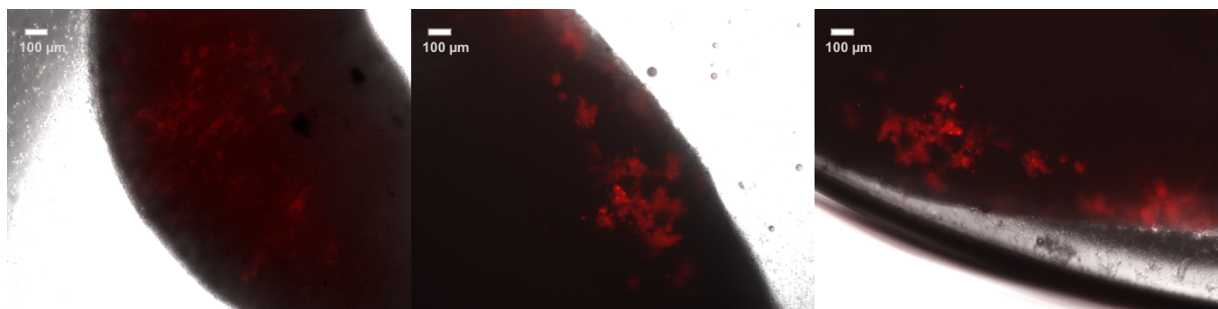


Abbildung 16: Kolonisation von Gonaden mit CB PGC mCherry 1B2

Gonaden von drei weiblichen Keimbahn-Chimären nach Injektion mit CB PGC mCherry 1B2. Die Bilder wurden in vierfacher Vergrößerung aufgenommen.

5.2.3.1 Test der mCherry CB PGC Keimbahn-Chimären auf Keimbahn-Transmission

Die männlichen Keimbahn-Chimären wurden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen. Nach Beginn der Geschlechtsreife wurde damit begonnen die Hähne abzusamen. Aus dem gewonnenen Sperma wurde genomische DNA isoliert. Diese wurde per PCR auf Anteile von transgenem Sperma untersucht. Hierfür wurden Primer verwendet, die spezifisch für eines der Gene der selektierbaren Markerkassette sind. Verwendet wurden spezifische Primer für das mCherry-Gen, das Puromycin-Resistenz-Gen oder den CAG-Promoter.

Chimären, die in mindestens zwei PCR-Reaktionen positive Ergebnisse zeigten, wurden mit wenigstens vier Wildtyp (LSL-classic) Hennen angepaart. Die Eier aus diesen Anpaarungen wurden gesammelt und inkubiert. An Inkubationstag 6 oder 7 wurden die Eier geöffnet und die Embryonen auf mCherry Expression untersucht. Hähne mit negativem PCR Ergebnis wurden euthanasiert. Untersucht wurde das Sperma von 19 Keimbahn-Chimären der Linie PGC CB mCherry 1B2 sowie von drei Keimbahn-Chimären der Linie CB PGC mCherry 1E2.

In Tabelle 15 ist eine Übersicht über die Chimären zu sehen, die in die Anpaarung genommen wurden, sowie das Ergebnis dieser Untersuchungen. Es konnte nur von einer Chimäre der Linie CB PGC mCherry 1B2 ein mCherry-positiver Embryo detektiert werden. Dieser war nach sieben Tagen Inkubation bereits abgestorben und weniger weit entwickelt als gleich alte mCherry-negative Embryonen. Um auszuschließen, dass es sich bei der gesehenen Fluoreszenz um Autofluoreszenz handelt, wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die für das mCherry-Gen spezifisch sind. Diese PCR war positiv, wie auch in Abbildung 17 zu sehen ist. Für die Zelllinie CB PGC mCherry 1E2 konnte keine Keimbahn-Transmission nachgewiesen werden.

Zelllinie	Hahn	Überprüfte Embryonen	Positive Embryonen
CB PGC mCherry 1B2	R009	245	0
	R011	297	1
	R021	338	0
	R026	98	0
	R035	189	0
CB PGC mCherry 1E2	R333	107	0
	R335	198	0
Gesamt		1472	1

Tabelle 15: Keimbahn-Transmissionsraten von mCherry CB PGC Keimbahn-Chimären

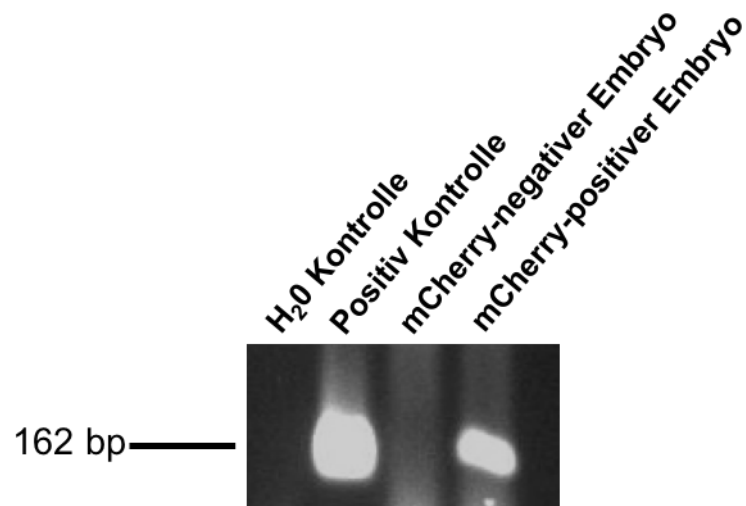


Abbildung 17: PCR zum Nachweis von Keimbahn-Transmission der Keimbahn-Chimäre CB PGC mCherry 1B2 R011

Aus der Anpaarung der Keimbahn-Chimäre CB PGC mCherry 1B2 R011 mit Wildtyp Hennen wurde bei der Überprüfung der Embryonen auf mCherry Expression ein mCherry-positiver Embryo gefunden. Es wurde eine PCR mit mCherry-Gen spezifischen Primern durchgeführt, um die Integration des mCherry-Gens nachzuweisen. Als positiv Kontrolle wurde das mCherry-attB Konstrukt verwendet. Es wurde eine Bande auf Höhe von 162 bp erwartet. Eine H₂O Kontrolle diente als negativ Kontrolle.

5.2.4 Erstellung mCherry-positiver LSL PGCs

Auf Grund der schlechten Effizienz der mCherry CB PGCs bezüglich der Besiedelung der Gonaden und Keimbahn-Transmission wurden LSL PGCs mit dem mCherry-attB Konstrukt transfiziert. Es wurden aus Gonaden gewonnene LSL PGCs (Gonozyten) verwendet. Das Vorgehen entsprach dem in 5.2.2 für die Erstellung der mCherry-positiven CB PGCs beschriebenen. Puromycin-resistente Zellklone wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop auf mCherry Expression untersucht. Die Effizienz der Transfektion lag bei sechs Klonen in 5×10^6 Zellen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen eingefroren.

5.2.5 Generierung von Keimbahn-Chimären mit LSL PGC mCherry Linien

Drei der erstellten LSL PGC mCherry Linien wurden in Embryonen injiziert, um Keimbahn-Chimären zu generieren. Das Vorgehen entsprach dem in 4.17 beschriebenen Verfahren. In Tabelle 16 sind die verwendeten Zelllinien, die Anzahl der erfolgreich injizierten und transferierten Embryonen sowie die Anzahl der geschlüpften und aufgezogenen Chimären zu sehen.

Zelllinie	Injizierte und transferierte Embryonen	Geschlüpfte Chimären (♂ und ♀)	Aufgezogene Keimbahn-Chimären (♂)
LSL PGC mCherry 11	55	30	15
LSL PGC mCherry 9	60	25	11
LSL PGC mCherry 10	54	40	16

Tabelle 16: Übersicht über die Injektionen von mCherry LSL PGC Linien in LSL-classic Embryonen

Nach Geschlechtsbestimmung per PCR mit W- und Z-Chromosom spezifischen Primern wurden weibliche Küken im Alter von etwa fünf Tagen euthanasiert. Um die Besiedelung der Gonaden durch die injizierten PGCs beurteilen zu können, wurden die Gonaden von beim Schlupf verstorbenen Küken oder euthanasierten weiblichen Küken präpariert und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es wurden die Gonaden von 13 LSL PGC mCherry 11

Chimären, elf LSL PGC mCherry 9 Chimären und 21 LSL PGC mCherry 10 Chimären auf die Besiedelung mit mCherry-positiven Zellen beurteilt. Die Effizienz der Kolonisation wurde geschätzt.

Alle drei injizierten mCherry LSL PGC Linien waren in der Lage die Gonaden zu besiedeln. Die Effizienz der Kolonisation lag für die Linie LSL PGC mCherry 11 zwischen 0 % und 20 %. Für die Linie LSL PGC mCherry 9 lag die Effizienz ebenfalls bei 0-20 % und für die Linie LSL PGC mCherry 10 bei 0-30 %. Abbildung 18 zeigt beispielhaft die Bilder der Gonaden von weiblichen Keimbahn-Chimären der Linie LSL PGC mCherry 10. 15 männliche Keimbahn-Chimären der Linie LSL PGC mCherry 11, elf der Linie LSL PGC mCherry 9 und 16 der Linie LSL PGC mCherry 10 wurden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen.

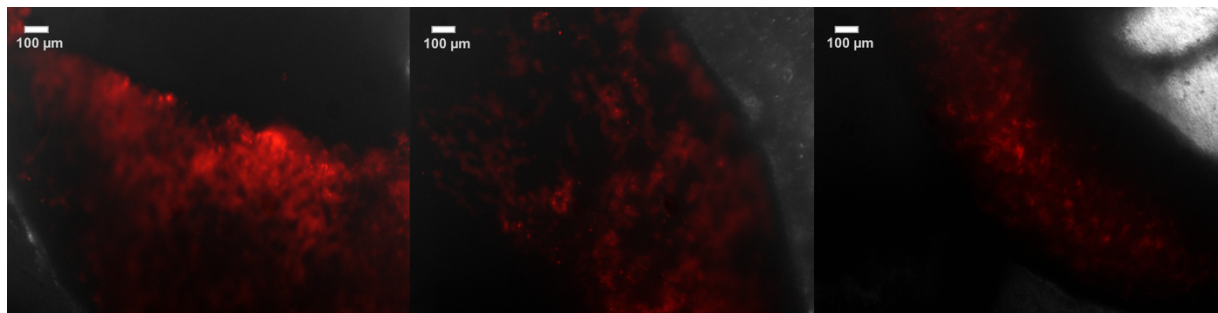


Abbildung 18: Kolonisation von Gonaden mit LSL PGC mCherry 10

Gonaden von drei weiblichen Keimbahn-Chimären nach Injektion mit LSL PGC mCherry 10. Die Bilder wurden mit vierfacher Vergrößerung aufgenommen.

5.2.6 Test der mCherry LSL PGC Keimbahn-Chimären auf Keimbahn-Transmission

Nach Erreichen der Geschlechtsreife wurden männliche LSL PGC mCherry Chimären mit je wenigstens neun LSL-classic Hennen angepaart. Die Eier wurden gesammelt und für sechs bis sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen auf mCherry Expression untersucht.

Tabelle 17 zeigt eine Übersicht über die so getesteten Keimbahn-Chimären und ihre Keimbahn-Transmissionsraten.

Zelllinie	Hahn	Überprüfte Embryonen	Positive Embryonen
LSL PGC mCherry 9	R108	69	1
LSL PGC mCherry 11	R139	180	0
	R149	30	1
Gesamt		279	2

Tabelle 17: Keimbahn-Transmissionsraten von mCherry LSL PGC Keimbahn-Chimären

Von den mCherry-positiven Embryonen wurde genomische DNA isoliert und eine PCR zur Überprüfung der Integration des mCherry-Gens durchgeführt. Die positiven Embryonen waren lebendig und gleich weit entwickelt wie entsprechende mCherry-negative Embryonen. Abbildung 19 zeigt einen mCherry-positiven Embryo sowie den erfolgreichen Nachweis der Integration des mCherry-Gens per PCR.

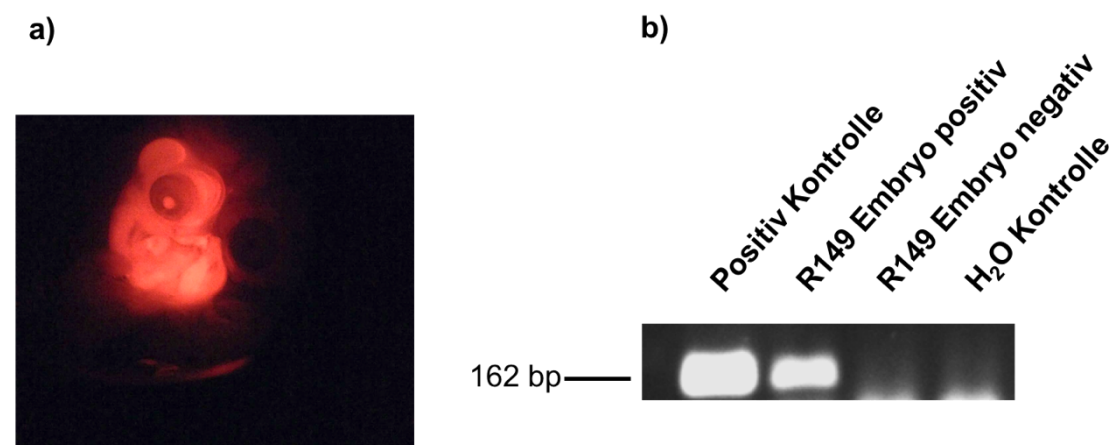


Abbildung 19: Erfolgreiche Keimbahn-Transmission von LSL PGC mCherry 11 Chimäre R149

a) Bild eines mCherry-positiven und eines gleichalten mCherry-negativen Embryos. **b)** Genomische DNA wurde von mCherry-positiven sowie mCherry-negativen Embryonen isoliert, um sie per PCR auf die Integration des mCherry-Gens zu überprüfen. Die erwartete Bandengröße lag bei 162 bp. Eine H₂O Kontrolle diente als negativ Kontrolle.

Eier von Chimären mit nachgewiesener Keimbahn-Transmission wurden bis zum Schlupf inkubiert. Die geschlüpften Küken wurden auf mCherry Expression untersucht. Eine Übersicht über die geschlüpften und untersuchten Küken ist in Tabelle 18 zu sehen. Die mCherry-positiven Küken waren phänotypisch gesund.

Zelllinie	Hahn	Geschlüpfte Küken	Positive Küken
LSL PGC mCherry 9	R108	173	1
LSL PGC mCherry 11	R149	180	2
Gesamt		353	3

Tabelle 18: Geschlüpfte Küken von LSL PGC mCherry Chimären mit nachgewiesener Keimbahn-Transmission

5.3 KNOCK-OUT DES TZR C γ -GENS

Eine Hühnerlinie mit einem Knock-out des C γ -Gens stellt ein wichtiges Modell zur Erforschung der Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen im Huhn dar. Um $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Hühner zu generieren, sollte das C γ -Gen ausgeschaltet werden. Da das C γ -Gen nur einmalig im Hühnergenom vorliegt, sollte die γ -Kette des $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptors dann nicht mehr rearrangiert werden können. Dies sollte zu einem vollständigen Verlust der $\gamma\delta$ T-Zellen führen, wenn die δ -Kette selbstständig nicht an die Zelloberfläche gelangen kann.

5.3.1 Sequenzierung des TZR C γ -Gens der CB Hühnerlinie

Um eine Hühnerlinie mit einem Knock-out des C γ -Gens zu erstellen, wurde zunächst das Zielgen in der CB Hühnerlinie kloniert und sequenziert.

Für die Klonierung der homologen Arme des Targeting Vektors für homologe Rekombination ist es wichtig die Sequenz des Zielgens in der verwendeten Zelllinie genau zu kennen. Schon geringe Abweichungen der Basensequenz zwischen den homologen Armen des Vektors und dem Zielgen können eine effiziente homologe Rekombination verhindern. Da der Targeting Vektor für homologe Rekombination in CB PGCs verwendet werden sollte, wurde das C γ -Gen mitsamt der flankierenden Sequenzen für diese Hühnerlinie kloniert und sequenziert. Insgesamt wurden 11239 bp in elf Segmenten kloniert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die dadurch erhaltene Sequenz wurde mit der von Adrian Six publizierte Sequenz des C γ -Gens verglichen [65].

Dabei ergab sich das von den sequenzierten 11239 bp 77 bp (0,7 %) im Vergleich zur publizierten Sequenz polymorph sind. Bei der Sequenzierung ergab sich kein Hinweis darauf, dass innerhalb der CB Hühnerlinie Polymorphismen oder verschiedene Allele vorliegen. Daher wurde angenommen, dass ein Targeting Vektor mit denselben Homologie-Armen für verschiedene CB PGC Linien verwendet werden kann.

5.3.2 Klonierung eines Targeting Vektors für homologe Rekombination zur Deletion des $C\gamma$ -Gens

Um das $C\gamma$ -Gen auszuschalten wurde ein Targeting Vektor kloniert. Dieser besteht aus einem 5' Homologie-Arm (2236 bp) und einem 3' Homologie-Arm (4632 bp). Die Homologie-Arme sind jeweils homolog zur den entsprechenden Regionen 5' beziehungsweise 3' des $C\gamma$ -Gens der CB Hühnerlinie. Zwischen den Homologie-Regionen befindet sich die selektierbare Markerkassette, bestehend aus einem eGFP-Gen unter einem Hühner- β -Aktin-Promoter sowie einem Puromycin-Resistenz-Gen unter einem CAG-Promoter. Die Markerkassette ist von jeweils zwei Kopien eines HS4-Insulators des Hühner- β -Globin Gens umgeben. LoxP-Stellen flankieren die HS4-eGFP-Puromycin Kassette. Damit die Möglichkeit besteht zukünftig fremde Gene in den $C\gamma$ Lokus einzufügen, ist zwischen der Kassette und dem 3' Homologie-Arm ein promoterloses Neomycin-Resistenz-Gen sowie eine attP-Rekombinationsstelle für sequenzspezifische Rekombination mit der phiC31 Integrase eingesetzt. Zur Erstellung des Targeting Vektors wurden aus einem bestehenden Vektor, der die Markerkassette enthielt, mittels Restriktionsenzymverdau die Homologie-Arme ausgeschnitten und die Homologie-Arme für den $C\gamma$ Lokus mittels Gibson Assembly Klonierung an die selektierbare Markerkassette angefügt.

Das Konstrukt wurde sequenziert, um seine Korrektheit zu überprüfen und erhielt die Konstrukte-Nummer K32. In Abbildung 20 ist ein Schema des Targeting Vektors $C\gamma$ KO 1 zu sehen.



Abbildung 20: Schema des Cy KO 1 Targeting Vektors

Der Targeting Vektor besteht aus den Homologie-Armen und einer selektierbaren Markerkassette mit β -Aktin-eGFP und CAG-Puro, flankiert von HS4-Insulator Elementen und LoxP-Stellen. Um später eine spezifische Rekombination mit phiC31 Integrase zu ermöglichen wurde eine attP-Rekombinationsstelle sowie ein promoterloses Neomycin-Resistenz-Gen eingefügt

5.3.3 Homologe Rekombination in CB PGCs

Der Targeting Vektor Cy KO 1 wurde in CB PGCs transfiziert. Bei der homologen Rekombination sollen sich die Homologie-Arme des Konstrukts an die homologen Regionen im Genom der Zellen anlagern, was zu einem Austausch der zwischen diesen Regionen liegenden Sequenz mit der selektierbaren Markerkassette führen kann (siehe Abbildung 21).

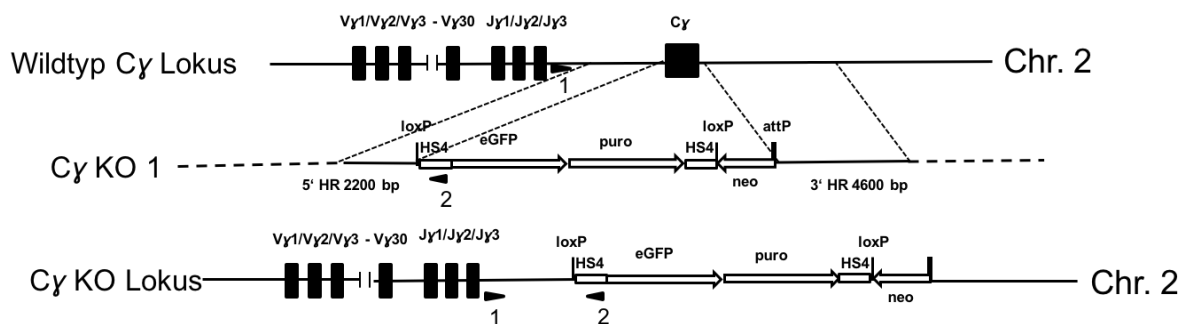


Abbildung 21: Schema des Cy TZR Wildtyp Locus, des Targeting Vektors und des Cy TZR KO Locus nach homologer Rekombination

1 und 2 kennzeichnet die Positionen der Primer, die verwendet wurden, um per PCR die korrekte Integration der Markerkassette nachzuweisen.

Je 5×10^6 CB PGCs wurden mit $10 \mu\text{g}$ linearisiertem Cy KO 1 per Elektroporation transfiziert. Nach Selektion mit Puromycin ab Tag 5 nach Transfektion über zehn Tage wurden die 48-Loch Flachbodenplatten mikroskopisch auf lebendige, eGFP-positive Zellen abgesucht. Diese positiven Klone wurden expandiert, bis eine Zellzahl von 1×10^6 erreicht war. Dann wurden 250000 Zellen zur Extraktion von genomischer DNA verwendet. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt, um die korrekte Integration der Markerkassette in den Cy Locus zu überprüfen.

Insgesamt wurden neun Elektroporationen mit je 5×10^6 CB PGCs von drei isogenen CB PGC Linien durchgeführt. Von diesen Elektroporationen konnten vier eGFP-positive, Puromycin-resistente Zellklone identifiziert, expandiert und per PCR auf korrektes Targeting überprüft werden. Für diese PCR wurde ein Primerpaar verwendet, bei dem der sense Primer außerhalb

des 5' Homologie-Armes im Hühnergenom liegt. Der antisense Primer liegt in der selektierbaren Markerkassette. Daher sollte nur dann ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 2500 bp entstehen, wenn der Targeting Vektor an der korrekten Stelle in das Genom integriert hat. Bei einem der vier Klone war dies der Fall, wie Abbildung 22 zeigt. Die Zelllinie erhielt die Bezeichnung CB PGC C γ KO 3F6. Die verwendeten Primer mit den Primer-Nummern 40 und 7 können Tabelle 6 entnommen werden.

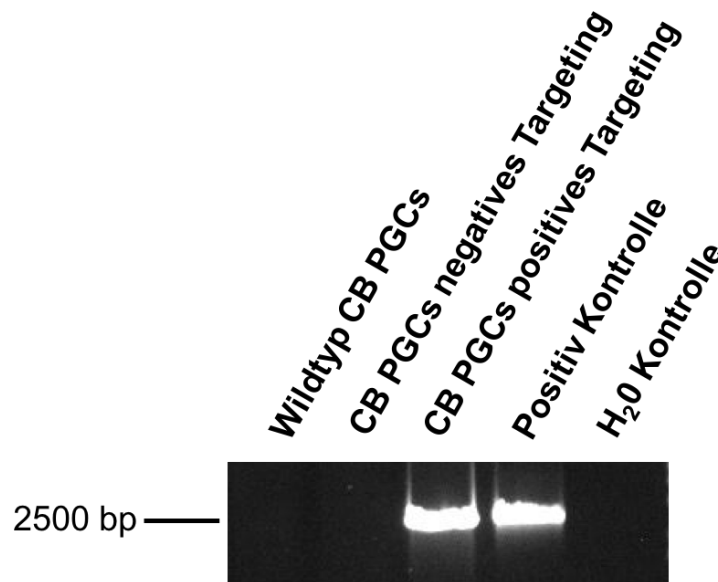


Abbildung 22: PCR Analyse von genomischer DNA klonal expandierter CB PGCs transfiziert mit C γ KO 1
Der sense Primer liegt upstream des 5' Homologie-Armes, der antisense Primer in der selektierbaren Markerkassette. Somit kann nur dann ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (ca. 2500 bp) entstehen, wenn der Vektor an der korrekten Stelle ins Genom integriert wurde. Als positiv Kontrolle wurde das Konstrukt C γ KO-positiv Kontrolle (K22) verwendet, als negativ Kontrolle diente eine H₂O Probe.

5.4 ETABLIERUNG DES CRISPR/CAS9-SYSTEMS IN HÜHNERZELLEN

Es sollte getestet werden, ob das CRISPR/Cas9-System das Potential hat, für *gene targeting* in PGCs eingesetzt zu werden.

5.4.1 Targeting von eGFP in DT40 Zellen

Für erste Versuche bezüglich Transfektions- und Targetingeffizienz des CRISPR/Cas9-Systems wurden nach Literaturrecherche Oligonukleotide für eine sgRNA entworfen, die das eGFP-Gen mit hoher Effizienz targeted [154]. Diese sgRNA erhielt die Nummer 1408. Die Oligonukleotide wurden in den Vektor PX330 (Konstrukte-Nummer 34) kloniert (siehe 4.10.3) und der Klonierungserfolg mittels Sequenzierung überprüft. Das entstandene Konstrukt PX330-sgRNA 1408 erhielt die Nummer 59.

Zunächst wurden Tests in DT40 Zellen durchgeführt, da diese einfacher und kostengünstiger zu kultivieren sind als PGCs und sich gut als Testsystem für letztere eignen.

Je 5×10^6 eGFP-positive, Puromycin-resistente DT40 Zellen wurden mit verschiedenen Mengen von PX330-sgRNA 1408 transfiziert. Fünf Tage nach der Elektroporation wurde die eGFP Expression im Durchflusszytometer überprüft. Wenn das CRISPR/Cas9-Konstrukt wie erwartet funktioniert, sollte sich durch Mutationen im eGFP-Gen der Anteil an eGFP-negativen Zellen erhöhen. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, waren bei der Verwendung von 5 μg PX330-sgRNA 1408 30 % der Zellen eGFP-negativ. Bei der Verwendung von 10 μg PX330-sgRNA 1408 erhöhte sich dieser Anteil auf knapp 40 % und bei der Verwendung von 15 μg PX330-sgRNA 1408 auf 45 %. Damit konnte nachgewiesen werden, dass das Konstrukt funktioniert und in DT40 Zellen mit hoher Effizienz zu Verschiebungen des Leserahmens im eGFP-Gen führt.

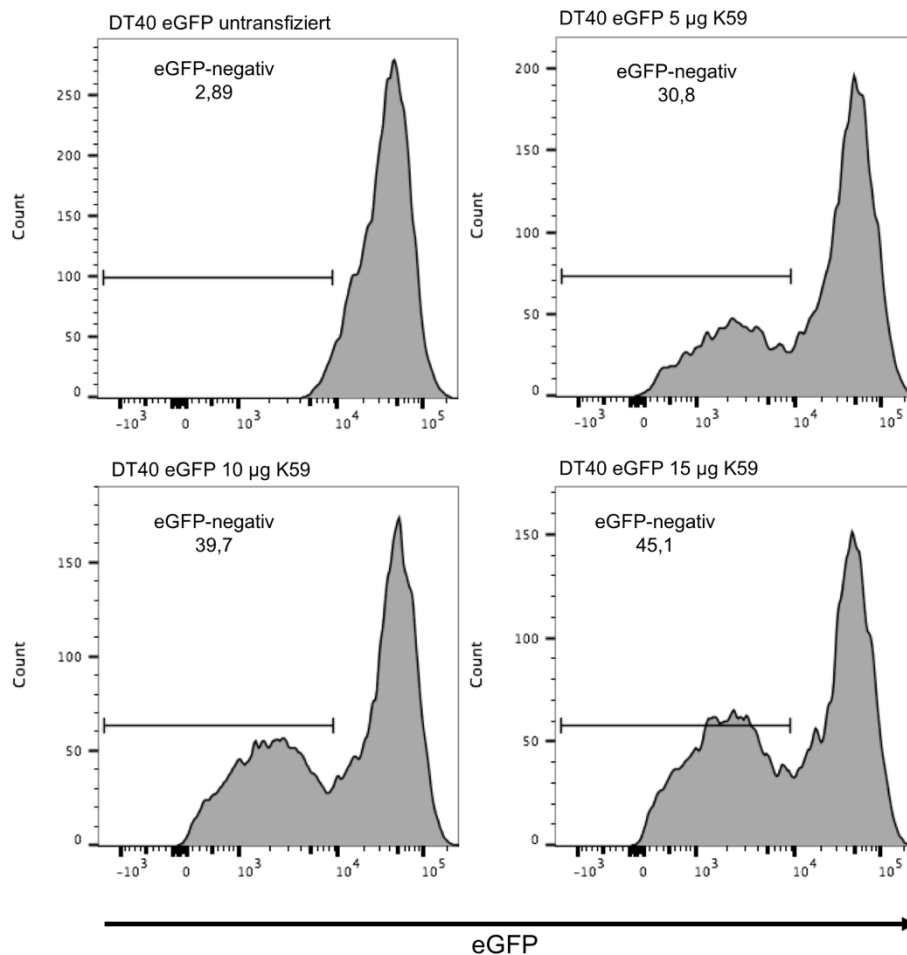


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven DT40 Zellen 5 Tage nach Transfektion mit 5, 10 oder 15 µg PX330-sgRNA 1408

Je 5×10^6 Zellen wurden mit der entsprechenden Menge PX330-sgRNA 1408 (K59) elektroporiert. sgRNA 1408 hat seine Zielsequenz im eGFP-Gen. Nach fünf Tagen wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um die Abnahme der eGFP Expression zu quantifizieren. Als Kontrolle wurden untransfizierte eGFP-positive DT40 Zellen verwendet.

Um die Möglichkeit zu haben erfolgreich transfizierte Zellen nach der Elektroporation anzureichern wurden weiterhin zwei CRISPR/Cas9-Plasmide mit Antibiotikaresistenz-Genen getestet. Der Vektor PX459 trägt ein Puromycin-Resistenz-Gen, der Vektor PX330-p2A-Hygromycin ein Hygromycin-Resistenz-Gen. PX330-p2A-Hygromycin wurde generiert, indem in den Vektor PX330 mittels Gibson Assembly Klonierung das Resistenzgen eingefügt wurde. In diese beiden Vektoren wurde jeweils die sgRNA-Sequenz 1408 kloniert, deren Zielsequenz im eGFP-Gen liegt.

Wiederum wurden je 5×10^6 DT40 Zellen mit je 10 µg DNA elektroporiert. Nach Antibiotikum-Selektion wurde die eGFP Expression durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Versuche mit PX459-sgRNA 1408 wurden eGFP-positive, Neomycin-resistente DT40 Zellen verwendet. 24 h nach Elektroporation wurden die Zellen mit 0,5x, 1x oder 1,5x

Puromycin behandelt oder unbehandelt gelassen. Für DT40 Zellen entspricht 1x Puromycin 0,5 µg Puromycin pro 1 ml Medium. Nach weiteren 48 h wurde das Antibiotikum abgewaschen und die Zellen in antibiotikumfreiem Medium für weitere 48 h kultiviert. An Tag 5 fand die durchflusszytometrische Analyse statt. Zur Kontrolle der Effizienz von PX459-sgRNA 1408 wurde auch eine Elektroporation mit PX330-sgRNA 1408 durchgeführt. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, konnte der Anteil an eGFP-negativen Zellen durch Selektion mit Puromycin über zwei Tage deutlich erhöht werden. Die Effizienz von PX459-sgRNA 1408 schien mit 23 % bei Verwendung von 10 µg etwas geringer zu sein als die von PX330-sgRNA 1408 (37,6 %). Nach Selektion mit Puromycin waren nahezu alle noch lebenden Zellen eGFP-negativ, was für eine sehr gut funktionierende Selektion spricht. Da die verwendete eGFP-positive, Neomycin-resistente DT40 Linie eine sehr heterogene eGFP Expression zeigt, wurden Wildtyp DT40 Zellen (= eGFP-negativ) mit in die Analyse eingeschlossen, um das Gate für eGFP-negative Zellen besser setzen zu können.

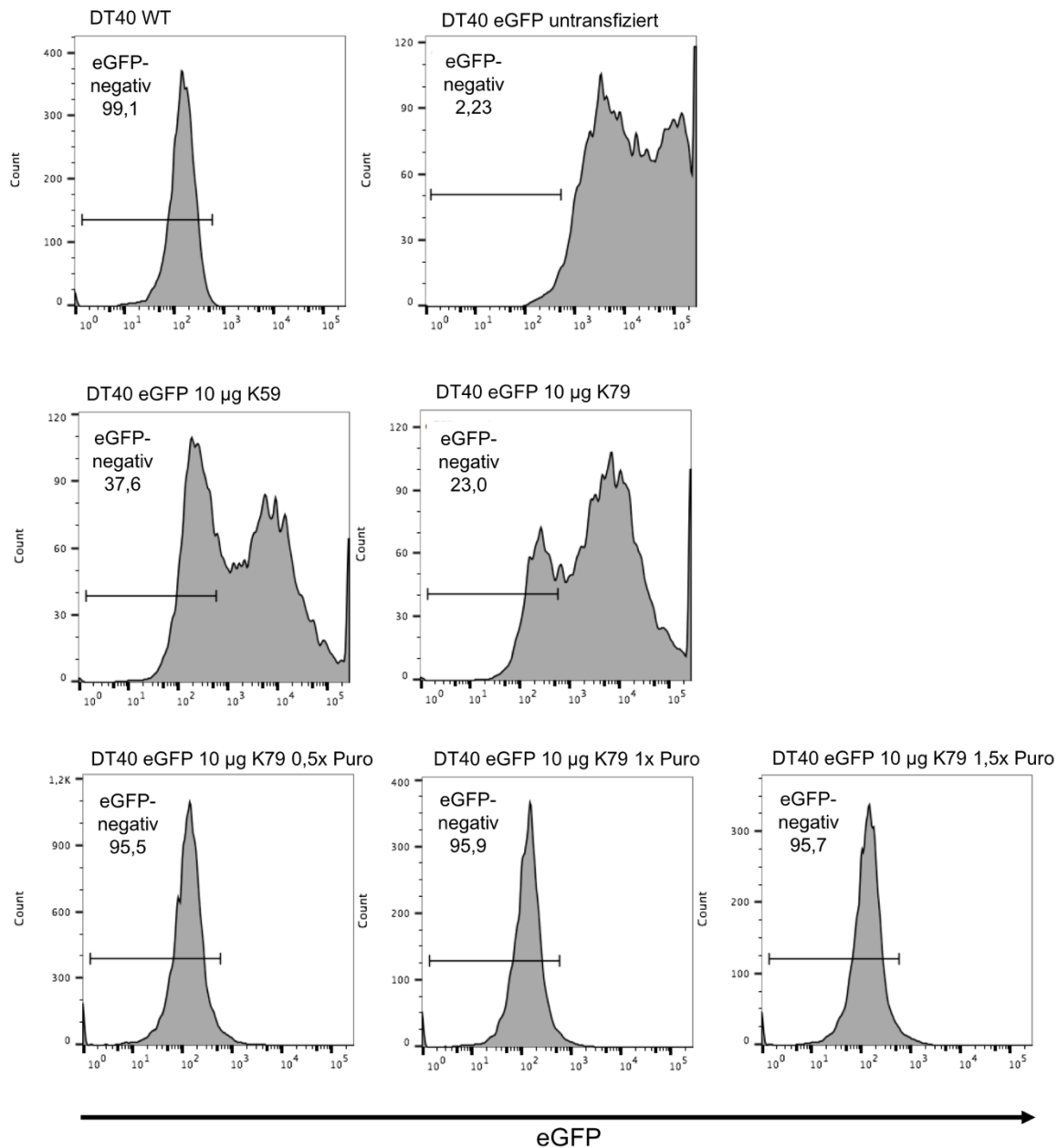


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven DT40 Zellen nach Transfektion mit 10 μ g PX459-sgRNA 1408

Je 5×10^6 eGFP-positive DT40 Zellen wurden mit 10 μ g PX459-sgRNA 1408 (K79) transfiziert, ohne oder mit anschließender Puromycin-Selektion über zwei Tage. Als Kontrollen wurden Wildtyp DT40 Zellen (eGFP-negativ), untransfizierte eGFP-positive DT40 Zellen sowie mit 10 μ g PX330-sgRNA 1408 (K59) transfizierte eGFP-positive DT40 Zellen verwendet. Die Selektion mit 0,5x, 1x oder 1,5x Puromycin begann 24 h nach Elektroporation. Nach weiteren 48 h wurde das Puromycin abgewaschen. Die durchflusszytometrische Analyse zur Kontrolle der eGFP Expression fand am fünften Tag nach der Elektroporation statt.

Für Testtransfektionen mit PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 wurden eGFP-positive, Puromycin-resistente DT40 Zellen verwendet. Der Versuchsaufbau war identisch zu den Testtransfektionen mit PX459-sgRNA 1408. Wiederum wurde eine Kontroll-Transfektion mit PX330-sgRNA 1408 durchgeführt. Für DT40 Zellen wurde durch Titration ermittelt, dass 1x Hygromycin 2000 μ g pro 1 ml Medium entsprechen. Die durchflusszytometrische Analyse

wurde nach zweitägiger Hygromycin-Selektion und zweitägiger Regenerationsphase für die Zellen an Tag 5 durchgeführt. Wie Abbildung 25 zeigt, ist die Effizienz von PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 identisch zu der von PX330-sgRNA 1408, in beiden Fällen 33,3 %. Durch zweitägige Selektion mit Hygromycin ließ sich der Anteil an eGFP-negativen Zellen deutlich steigern. Nach Selektion mit 0,5x Hygromycin ergaben sich 83,5 %, mit 1x Hygromycin 94,8 % und mit 1,5x Hygromycin 97,1 % eGFP-negative Zellen. Durch die Selektion mit Hygromycin wurden sehr viele Zellen abgetötet, sodass der Anteil an lebenden Zellen gering war. Zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Analyse lebten 78,2 % der untransfizierten DT40 Zellen. Nach Transfektion mit 10 µg PX330-2pA-Hygromycin-sgRNA 1408 verringerte sich dieser Anteil auf 31 %, und durch Selektion mit 0,5x Hygromycin auf 36,4 %. Bei Selektion mit 1x Hygromycin lag der Anteil lebender Zellen bei 7,8 % und bei Verwendung von 1,5x Hygromycin lag der Anteil lebender Zellen bei 2,20 %. Dies ist in Abbildung 26 zu sehen.

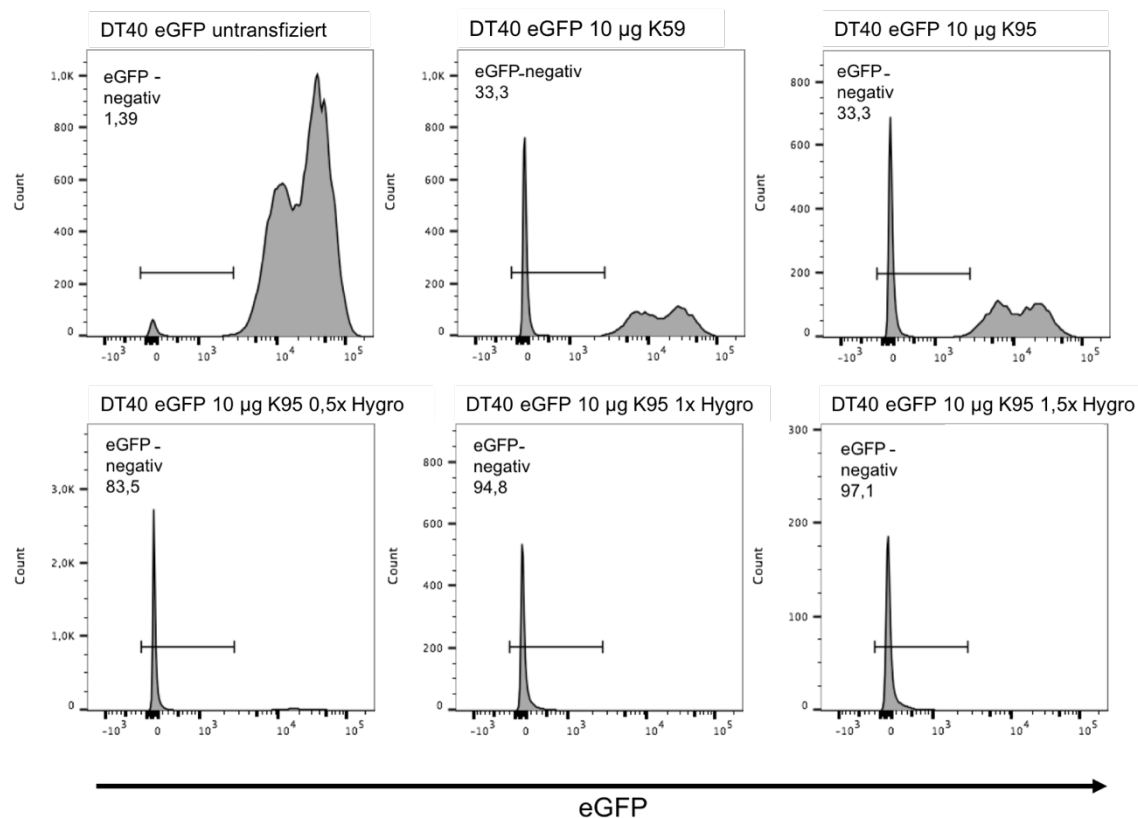


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven DT40 Zellen nach Transfektion mit 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408

Je 5×10^6 eGFP-positive DT40 Zellen wurden mit 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 (K95) elektroporiert, ohne oder mit anschließender Hygromycin-Selektion über zwei Tage. Als Kontrollen wurden untransfizierte eGFP-positive DT40 Zellen sowie mit 10 µg PX330-sgRNA 1408 (K59) transfizierte eGFP-positive DT40 Zellen verwendet. Die Selektion mit 0,5x, 1x oder 1,5x Hygromycin begann 24 h nach Elektroporation. Nach weiteren 48 h wurde das Hygromycin abgewaschen. Die durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der eGFP Expression fand am Tag 5 nach Elektroporation statt.

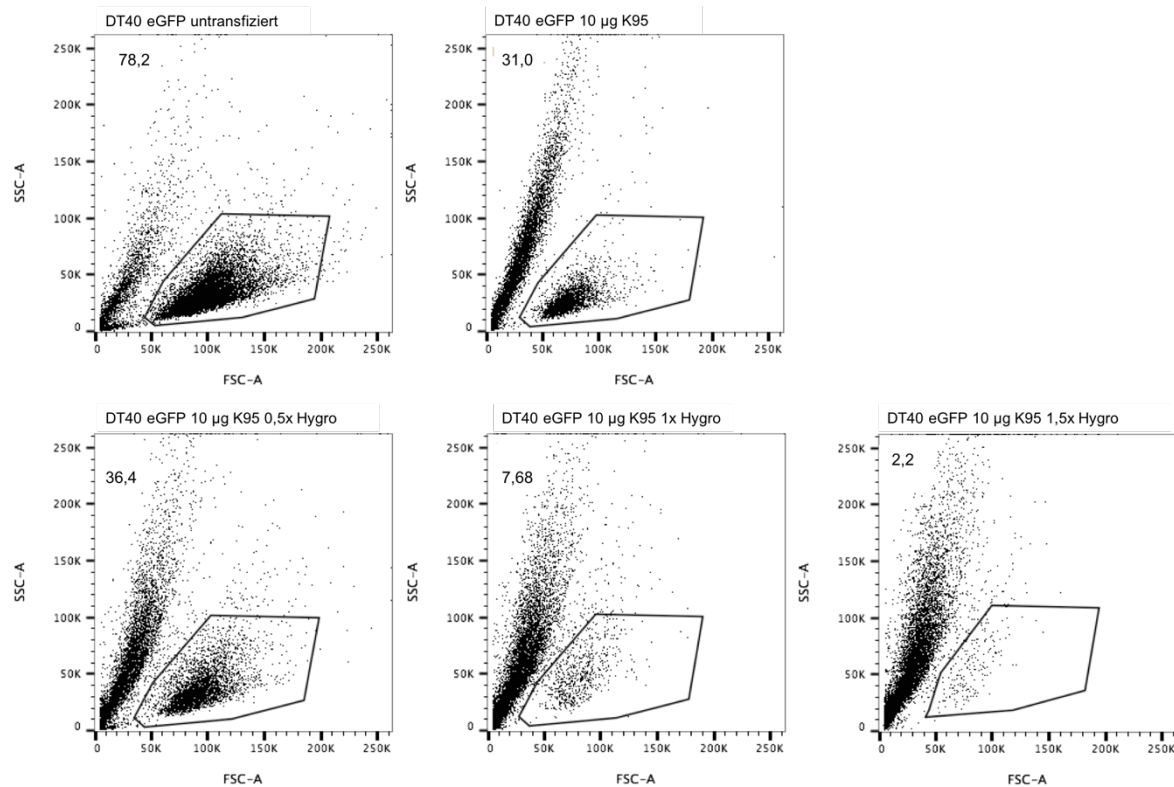


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven DT40 Zellen, untransfiziert oder nach Transfektion mit 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408

Je 5×10^6 eGFP-positive DT40 Zellen wurden mit 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 (K95) elektroporiert, ohne oder mit anschließender Hygromycin-Selektion über zwei Tage. Die Selektion mit 0,5x, 1x oder 1,5x Hygromycin begann 24 h nach Elektroporation. Nach weiteren 48 h wurde das Hygromycin abgewaschen. Die durchflusszytometrische Analyse Expression fand am Tag 5 nach Elektroporation statt. Das Gate wurde auf lebende Zellen gelegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das CRISPR/Cas9-System grundsätzlich im DT40 Testsystem mit hoher Effizienz funktioniert. Auch eine Anreicherung der erfolgreich transfizierten Zellen durch Selektion mit Antibiotika ist möglich.

5.4.2 Targeting von eGFP in PGCs

Nach den erfolgreichen Versuchen in DT40 Zellen wurde das CRISPR/Cas9-System auch in PGCs getestet.

Hierfür wurden als erstes eGFP-positive, Puromycin-resistente PGCs, die von der eGFP-Hühnerlinie 165-2 gewonnen worden waren, per Elektroporation mit PX330-sgRNA 1408 transfiziert. Verwendet wurden jeweils 5×10^6 Zellen mit 10 oder 15 µg DNA. Die durchflusszytometrische Analyse wurde erst sieben Tage nach Elektroporation durchgeführt, da die PGCs aufgrund ihres langsameren Wachstums eine längere Regenerationsphase benötigten. Wie Abbildung 27 zeigt, erhöhte sich der Anteil an eGFP-negativen Zellen auf 3 %

wenn 10 μg PX330-sgRNA 1408 verwendet wurden. Bei Verwendung von 15 μg PX330-sgRNA 1408 entstanden knapp 6,5 % eGFP-negative Zellen. Damit ist die Effizienz in PGCs im Vergleich zu DT40 Zellen deutlich geringer. Dies war auf Grund der im Allgemeinen geringen Transfektionseffizienz in PGCs zu erwarten.

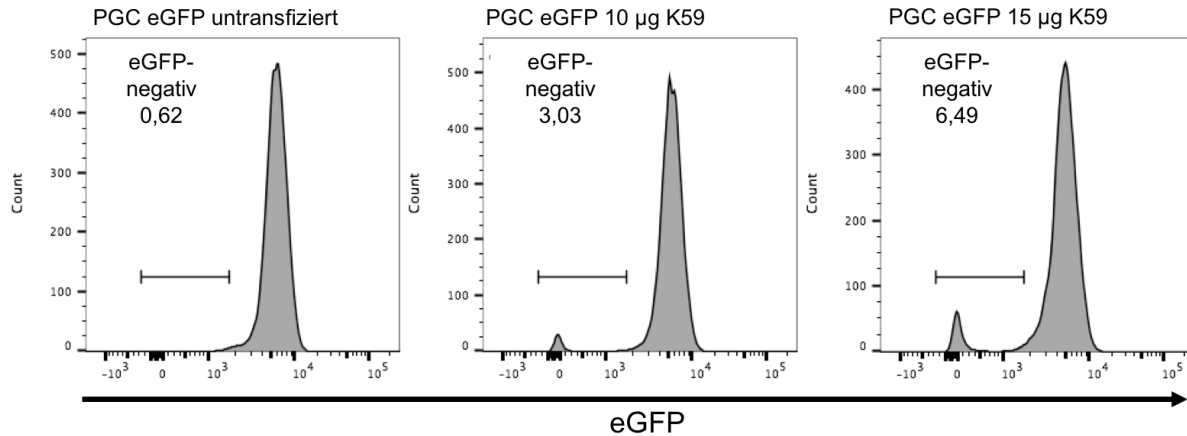


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven PGCs nach Transfektion mit 10 oder 15 μg PX330-sgRNA 1408

Je 5×10^6 Zellen wurden mit der entsprechenden Menge PX330-sgRNA 1408 (K59) elektroporiert. Nach sieben Tagen wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um die Abnahme der eGFP Expression zu quantifizieren. Als Kontrolle wurden untransfizierte eGFP-positive PGCs mitgeführt.

Auch in PGCs wurde die Antibiotikum-Selektion nach Transfektion getestet. Da nur Puromycin-resistente, eGFP-positive PGCs zur Verfügung standen konnte PX459-sgRNA 1408 nicht getestet werden.

Je 5×10^6 Zellen wurden mit 10 μg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 transfiziert. Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen mit 0,5x oder 1x Hygromycin behandelt. Laut laboreigenen Kontrollen entspricht für PGCs 1x Hygromycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Weil nach 48 h Selektion noch kaum ein Absterben der Zellen bemerkbar war, wurden die Zellen geteilt und je ein Ansatz antibiotikumfrei weiter kultiviert und ein Ansatz für weitere 72 h unter Selektion belassen. Am Tag 5 wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist konnte durch die Selektion mit 0,5x beziehungsweise 1x Hygromycin über zwei oder fünf Tage nur eine schwache Anreicherung der eGFP-negativen Zellen erreicht werden. Nach Selektion mit 0,5x Hygromycin über zwei Tage zeigten sich 1,56 % eGFP negative Zellen, nach fünf Tagen 3,06 %. Für 1x Hygromycin ergaben sich 2,53 % eGFP-negative Zellen nach zwei Tagen Selektion und 5,97 % nach fünf Tagen. Auf Grund dieses Ergebnisses und der Beobachtung, dass sowohl nach zwei als auch fünf Tagen Selektion nur wenig mehr abgestorbene Zellen als in der unselektierten Kontrolle zu sehen waren, kann

davon ausgegangen werden, dass die Hygromycin-Menge zu gering war. Daher wurde Hygromycin neu auf eGFP-positiven PGCs titriert und eine 1x Dosis von 400 µg pro 1 ml Medium ermittelt.

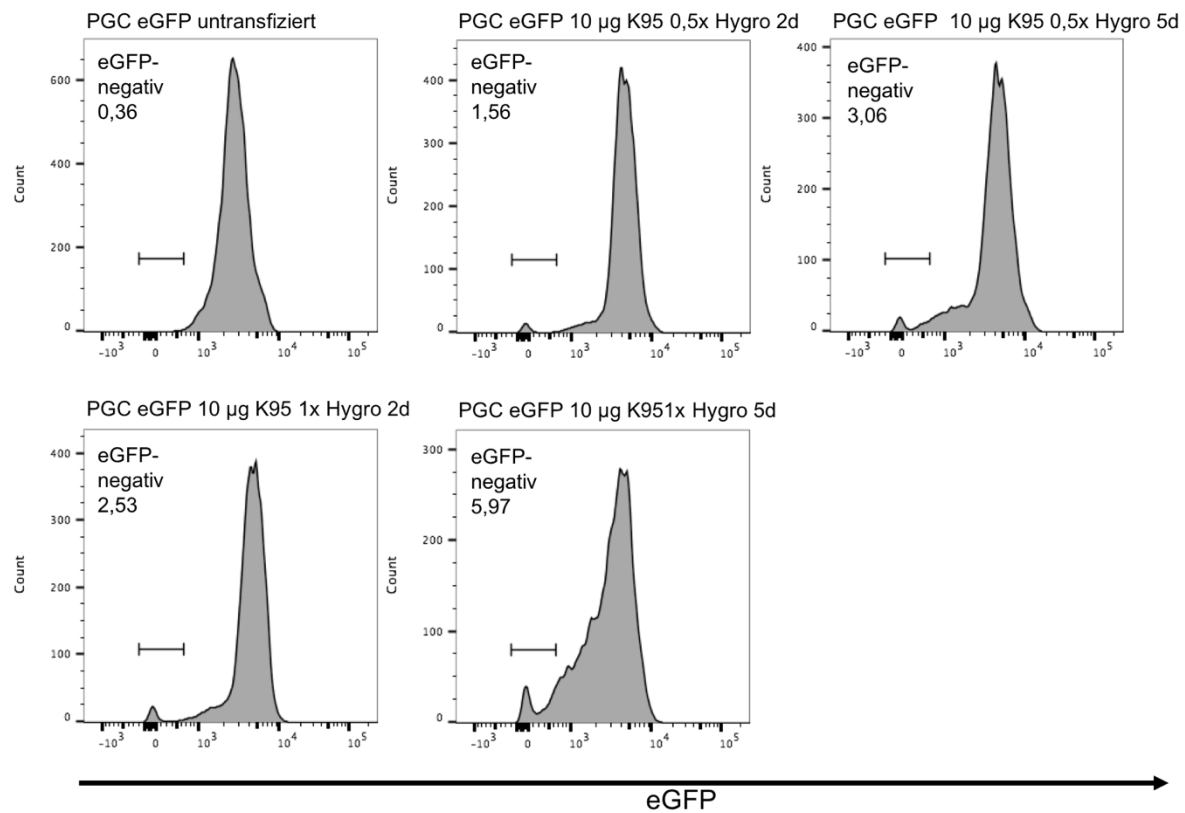


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven PGCs nach Transfektion mit PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408

Je 5×10^6 Zellen wurden mit 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 (K95) elektroporiert. Anschließend folgte die Hygromycin-Selektion über zwei oder fünf Tage. Als Kontrollen wurden untransfizierte eGFP-positive PGCs verwendet. Die Selektion mit 0,5x oder 1x Hygromycin begann 24 h nach Elektroporation. Nach weiteren 72 h wurde das Hygromycin abgewaschen oder die Zellen für weitere 48 h unter Selektion belassen. Die durchflusszytometrische Analyse fand am Tag 5 nach Elektroporation statt.

Je 3×10^6 eGFP-positive PGCs wurden mit 3 µg oder 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 transfiziert. Für diese Elektroporationen wurde das Amaxa® Nucleofector® II Device verwendet. Nach 24 h wurden die Zellen für 48 h mit Hygromycin in einer Konzentration von 400 µg pro 1 ml Medium selektiert. An Tag 4 nach Transfektion wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Wie Abbildung 29 zeigt, konnten auf diese Weise bei Verwendung von 3 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 16,1 % eGFP-negative Zellen erreicht werden und bei Verwendung von 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 22,6 %.

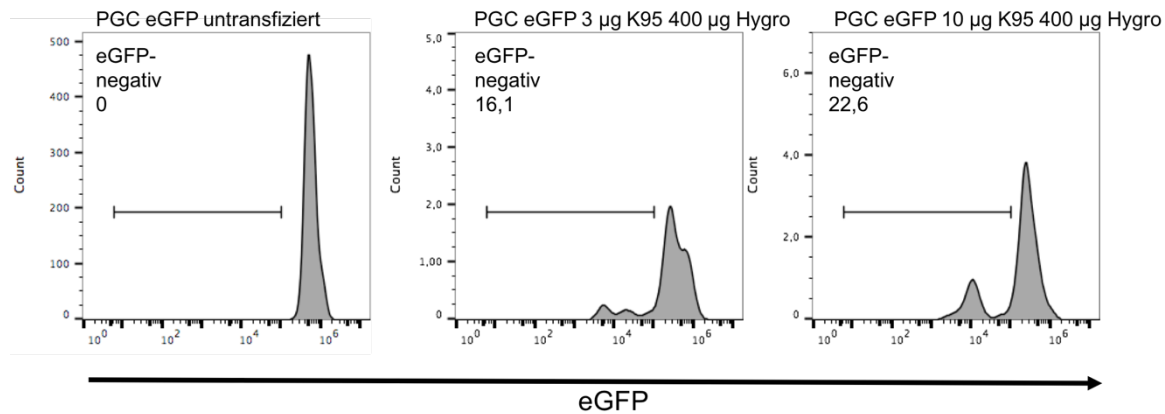


Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-positiven PGCs nach Transfektion mit PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 und Selektion mit 400 µg/ml Hygromycin

Je 3×10^6 Zellen wurden mit 3 oder 10 µg PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 (K95) elektroporiert. Anschließend folgte die Hygromycin-Selektion über zwei Tage. Als Kontrollen wurden untransfizierte eGFP-positive PGCs verwendet. Die Selektion mit 400 µg/ml Hygromycin begann 24 h nach Elektroporation. Nach weiteren 72 h wurde das Hygromycin abgewaschen. Die durchflusszytometrische Analyse fand am Tag 4 nach Elektroporation statt.

5.4.3 Etablierung von sgRNA-Sequenzen für das C γ -Gen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das CRISPR/Cas9-System prinzipiell in den verwendeten Zellkultursystemen funktioniert, wurde als nächstes nach effizienten sgRNA-Sequenzen gesucht, die das 5' oder 3' Ende des C γ -Gens zum Ziel haben.

Mit Hilfe des von Zhang Lab @ MIT (Massachusetts Institute of Technology) zur Verfügung gestellten Online Tools CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu>) wurde nach in Frage kommenden Sequenzen gesucht. Ausgewählt wurden zwei sgRNA-Sequenzen (sgRNA 1409 und 1410), bei deren Verwendung der von Cas9 eingefügte Doppelstrangbruch unmittelbar am 3' Ende des C γ -Gens entstehen sollte, sowie drei sgRNA-Sequenzen (sgRNA 1403, 1411 und 1412), bei deren Verwendung der von Cas9 eingefügte Doppelstrangbruch unmittelbar am Beginn des C γ -Gens platziert wäre. Abbildung 30 zeigt ein Schema des C γ -Gens sowie die Positionen der Doppelstrangbrüche, die bei Verwendung der genannten sgRNAs durch Cas9 eingefügt werden.

Die Oligonukleotide für diese sgRNAs wurden in den Vektor PX330 (K34) kloniert (siehe 4.10.3). Die entstandenen Konstrukte PX330-sgRNA 1409, PX330-sgRNA 1410, PX330-sgRNA 1403, PX330-sgRNA 1411 und PX330-sgRNA 1412 wurden sequenziert, um sie auf ihre Korrektheit zu überprüfen.

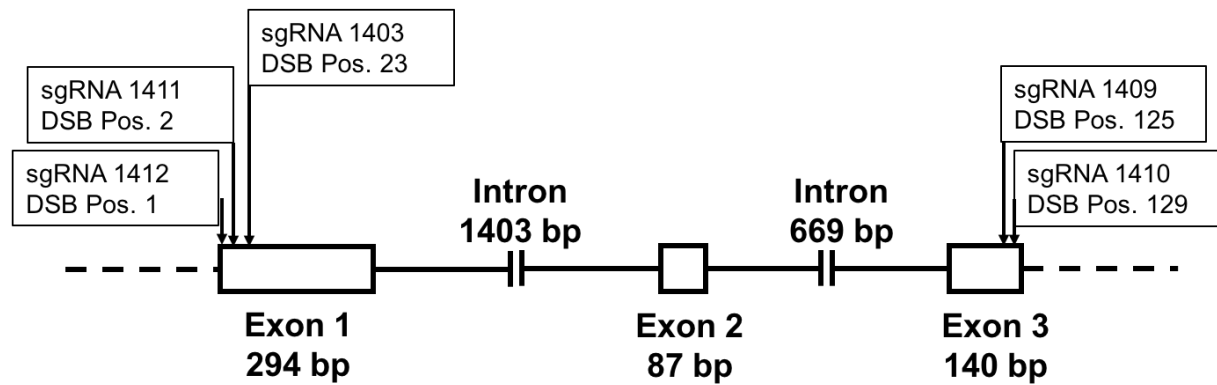


Abbildung 30: Schema des *Cy-Gens* sowie der Positionen (Pos.) der sgRNA-Sequenzen und der durch Cas9 eingefügten Doppelstrangbrüche.

Da es anhand des Webtools nicht möglich ist eine Vorhersage über die tatsächliche Targetingeffizienz der jeweiligen sgRNA zu treffen, musste diese zunächst getestet werden.

5.4.3.1 Testtransfektionen in DT40 Zellen und T7 Endonuklease Assay

Zunächst wurden die sgRNAs 1409, 1410, 1411 und 1412 getestet. Je 5×10^6 DT40 Zellen wurden mit je 15 μg PX330-sg RNA 1409, PX330-sgRNA 1410, PX330-sgRNA 1411 oder PX330-sgRNA 1412 per Elektroporation transfiziert. Nach vier Tagen wurde von den transfizierten Zellen genomische DNA gewonnen und ein T7 Endonuklease Assay durchgeführt, um durch die Cas9 entstandene Doppelstrangbrüche und dadurch resultierende fehlerhafte DNA-Reparaturen zu detektieren.

Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist, konnte für die Proben der mit PX330-sgRNA 1409 und PX330-sgRNA 1410 transfizierten Zellen erfolgreich ein T7 Endonuklease Assay durchgeführt werden. Für PX330-sgRNA 1410 konnten zusätzliche Banden der erwarteten Größe von etwa 110 bp und 360 bp sichtbar gemacht werden, was darauf hinweist, dass Cas9 in Kombination mit dieser sgRNA schneidet. Für PX330-sgRNA 1409 gab es kein positives Ergebnis. Es wurde daher der Entschluss gefasst, mit sgRNA 1410 weiter zu arbeiten.

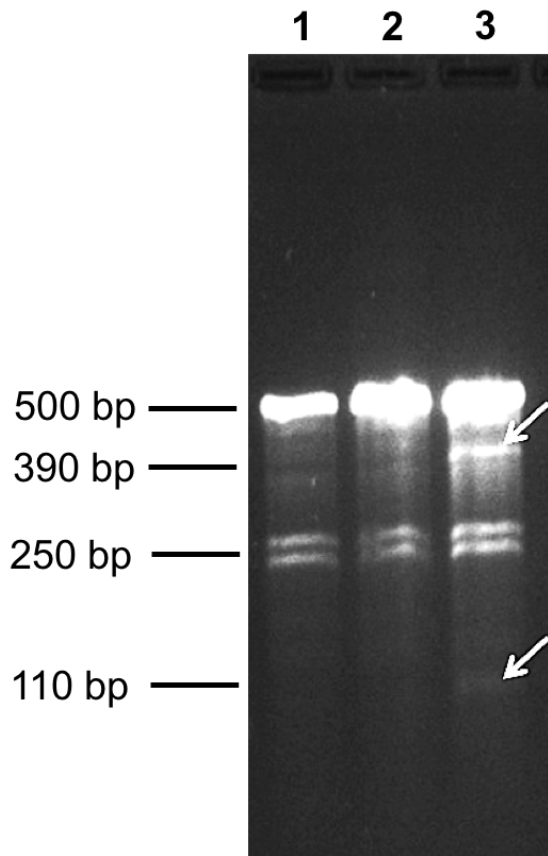


Abbildung 31: T7 Endonuklease Assay für PX330-sgRNA 1409 und PX330-sgRNA 1410

DT40 Zellen wurden mit je 15 µg der Konstrukte PX330-sgRNA 1409 oder PX330-sgRNA 1411 transfiziert. 4 Tage nach Transfektion wurde genomische DNA isoliert, per PCR ein Amplifikat (500 bp) hergestellt und ein T7 Endonuklease Assay durchgeführt. Bei erfolgreicher Induktion von Mutationen nach Cas9 induziertem Doppelstrangbruch wurden zusätzliche Banden in der Größe von etwa 110 bp und 390 bp erwartet. Banden in dieser Höhe sind für PX330-sgRNA 1410 mit Pfeilen markiert.

1) untransfizierte DT40 Zellen; 2) DT40 Zellen transfiziert mit 15 µg PX330-sgRNA 1409; 3) DT40 Zellen transfiziert mit 15 µg PX330-sgRNA 1410

Auch für die Proben der mit PX330-sgRNA 1411 und PX330-sgRNA 1412 transfizierten Zellen wurde ein PCR Amplifikat hergestellt und ein T7 Endonuklease Assay durchgeführt. Für keine der beiden Proben konnten die erwarteten zusätzlichen Banden in der Höhe von etwa 365 bp und 105 bp festgestellt werden.

5.4.3.2 Testtransfektionen in DT40 Zellen und Deletion des *Cy*-Gens

Wenn ein sgRNA-Cas9-Konstrukt für die 5' Seite und ein sgRNA-Cas9-Konstrukt für die 3' Seite gemeinsam transfiziert werden, sollte es bei gleichzeitigem Doppelstrangbruch an beiden Zielsequenzen zu einem Loop-out der dazwischenliegenden Bereiche und damit einer Deletion des *Cy*-Gens kommen. Die Deletion des Gens lässt sich per PCR nachweisen, wenn das verwendete Primerpaar so gewählt wird, dass es außerhalb der Schnittstellen der Cas9 liegt und die Extensionszeit so kurz gewählt wird, dass nur bei Deletion des Gens ein PCR Amplifikat entstehen kann. Schematisch wird die Deletion des *Cy*-Gens in Abbildung 32 dargestellt.

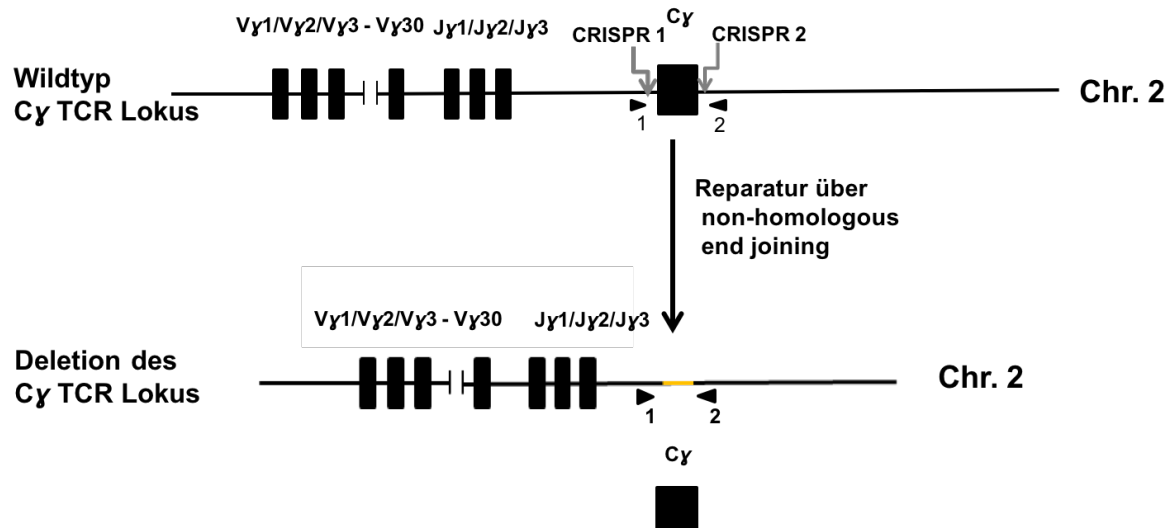


Abbildung 32: Grafik des C γ Lokus vor und nach Deletion durch CRISPR/Cas9-System

1 und 2 kennzeichnen Positionen der Primer, die verwendet wurden um die Deletion des C γ -Gens per PCR nachzuweisen.

Für diesen Versuch wurden je 3×10^6 DT40 Zellen mit entweder je 10 μ g PX330-sgRNA 1410 und PX330-sgRNA 1403, mit je 10 μ g PX330-sgRNA 1410 und PX330-sgRNA 1411 oder mit je 10 μ g PX330-sgRNA 1410 und PX330-sgRNA 1412 transfiziert. Tabelle 19 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Elektroporationen.

Zellzahl	PX330-sgRNA 1410	PX330-sgRNA 1403	PX330-sgRNA 1411	PX330-sgRNA 1412
3×10^6	10 μ g	10 μ g	-	-
3×10^6	10 μ g	-	10 μ g	-
3×10^6	10 μ g	-	-	10 μ g

Tabelle 19: Durchgeführte Transfektionen zum Test von CRISPR/Cas9-Konstrukten in DT40 Zellen

Drei Tage nach Transfektion wurde genomische DNA isoliert und eine PCR durchgeführt. Für die PCR wurden je 250 ng DNA verwendet. Das PCR Produkt sollte bei erfolgreicher Deletion des C γ -Gens 270 bp groß sein, ohne Deletion etwa 2900 bp. Wie Abbildung 33 zeigt, konnte für alle drei Kombinationen eine Deletion des C γ -Gens nachgewiesen werden, während sich in der Kontrolle (untransfizierte DT40 Zellen) keine Bande zeigt. Da die Kombination PX330-sgRNA 1410 und PX330-sgRNA 1403 die stärkste Bande aufweist, wurde mit diesen beiden sgRNA-Sequenzen weitergearbeitet.

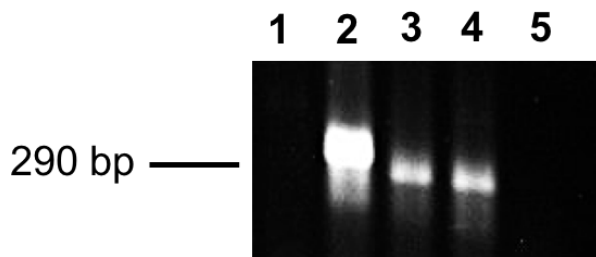


Abbildung 33: PCR zum Nachweis der Deletion des Cy-Gens

DT40 Zellen wurden entweder mit je 10 µg von PX330-sgRNA 1410 und PX330-sgRNA1403 oder mit je 10 µg PX330-sgRNA 1410 und PX330-sgRNA 1411 oder mit je 10 µg PX330-sgRNA 1410 und PX330-sgRNA 1412 transfiziert. Drei Tage nach Transfektion wurde genomische DNA gewonnen und eine PCR zum Nachweis der Deletion des Cy-Gens durchgeführt. Die erwartete Banden-Größe bei erfolgreicher Deletion war 290 bp. Genomische DNA von untransfizierten DT40 Zellen wurde als Kontrolle verwendet. Es wurden je 250 ng DNA eingesetzt.

1) untransfizierte DT40 Zellen; 2) DT40 Zellen transfiziert mit je 10 µg PX330-sgRNA1410 und PX330-sgRNA 1403; 3) DT40 Zellen transfiziert mit je 10 µg PX330-sgRNA1410 und PX330-sgRNA 1411; 4) DT40 Zellen transfiziert mit je 10 µg PX330-sgRNA1410 und PX330-sgRNA 1412; 5) H₂O Kontrolle

5.4.3.3 Test eines Vektors zur gleichzeitigen Expression zweier sgRNAs

Um die Möglichkeit zu haben, zwei sgRNA-Sequenzen gemeinsam zu transfizieren ohne die Zellen der doppelten Menge DNA aussetzen zu müssen, wurde PX333 (Konstrukte-Nummer 78) getestet. PX333 ist ein Vektor zur gleichzeitigen Expression zweier sgRNAs von unabhängigen U6 Promotoren. Die Oligonukleotide für die sgRNAs 1403 und 1410 wurden in den Vektor PX333 kloniert (siehe 4.10.3). Das entstandene Konstrukt PX333-sgRNAs 1403 und 1410 wurde zur Überprüfung sequenziert.

Für eine Transfektion wurden je 5×10^6 DT40 Zellen verwendet. Eine Übersicht der durchgeführten Transfektionen ist in Tabelle 20 zu sehen.

Zellzahl	PX330-sgRNA 1403	PX330-sgRNA 1410	PX333-sgRNAs 1403 und 1410
5×10^6	10 µg	10 µg	-
5×10^6	-	-	10 µg
5×10^6	-	-	15 µg
5×10^6	-	-	20 µg

Tabelle 20: Durchgeführte Transfektionen in DT40 Zellen zum Test von PX333

Fünf Tage nach Transfektion wurde genomische DNA aus den Zellen isoliert und eine PCR zum Nachweis der Deletion des *Cy*-Gens durchgeführt. Hierbei binden die verwendeten Primer außerhalb der Schnittstellen der Cas9. Das erwartete PCR-Produkt bei erfolgreicher Deletion des *Cy*-Gens ist 290 bp groß. Als positiv Kontrolle wurde genomische DNA von DT40 Zellen verwendet, für die die Deletion bereits per PCR nachgewiesen werden konnte. Außerdem wurde eine Kontroll-Transfektion mit je 10 µg PX330-sgRNA 1403 und PX330-sgRNA 1410 durchgeführt. In der PCR wurden je 500 ng DNA als Template eingesetzt. In Abbildung 34 ist zu sehen, dass auch bei Verwendung von PX333-sgRNAs 1403 und 1410 die Deletion nachweisbar war.

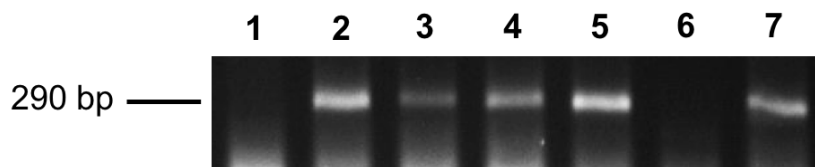


Abbildung 34: PCR zum Nachweis der Deletion des *Cy*-Gens in DT40 Zellen nach Transfektion mit PX333-sgRNAs 1403 und 1410

DT40 Zellen wurden entweder mit je 10 µg PX330-sgRNA 1410 und PX330-sgRNA 1403 oder mit 10, 15 oder 20 µg PX333-sgRNAs 1403 und 1410 transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurde genomische DNA gewonnen und eine PCR zum Nachweis der Deletion des *Cy*-Gens durchgeführt. Die erwartete Banden-Größe bei erfolgreicher Deletion war 290 bp. Genomische DNA von untransfizierten DT40 Zellen wurde als negativ Kontrolle verwendet, genomische DNA von DT40 Zellen mit bereits nachgewiesener Deletion des *Cy*-Gens als positiv Kontrolle. Es wurden je 500 ng DNA eingesetzt.

1) untransfizierte DT40 Zellen; 2) DT40 Zellen transfiziert mit je 10 µg PX330-sgRNA 1410 und PX330-sgRNA 1403; 3) DT40 Zellen transfiziert mit 10 µg PX333-sgRNAs 1403 und 1410; 4) DT40 Zellen transfiziert mit 15 µg PX333-sgRNAs 1403 und 1410; 5) DT40 Zellen transfiziert mit 20 µg PX333-sgRNAs 1403 und 1410; 6) H₂O Kontrolle; 7) Positiv Kontrolle

5.5 CRISPR/CAS9-SYSTEM UND HOMOLOGE REKOMBINATION IN CB PGCS

Nach erfolgreicher Etablierung von effizienten sgRNA-Sequenzen für die 5' und 3' Seite des *Cy*-Gens sollten nun Kombinationen von CRISPR/Cas9-Konstrukten und homologer Rekombination geprüft werden mit dem Ziel, das *Cy*-Gens auszuschalten und an diesem Locus eine Markerkassette einzufügen.

5.5.1 Kombination von CRISPR/Cas9-System und *Cy* KO 1 in CB PGCs

Abbildung 35 zeigt schematisch die Kombination von *Cy* KO 1 und CRISPR/Cas9-Konstrukten.

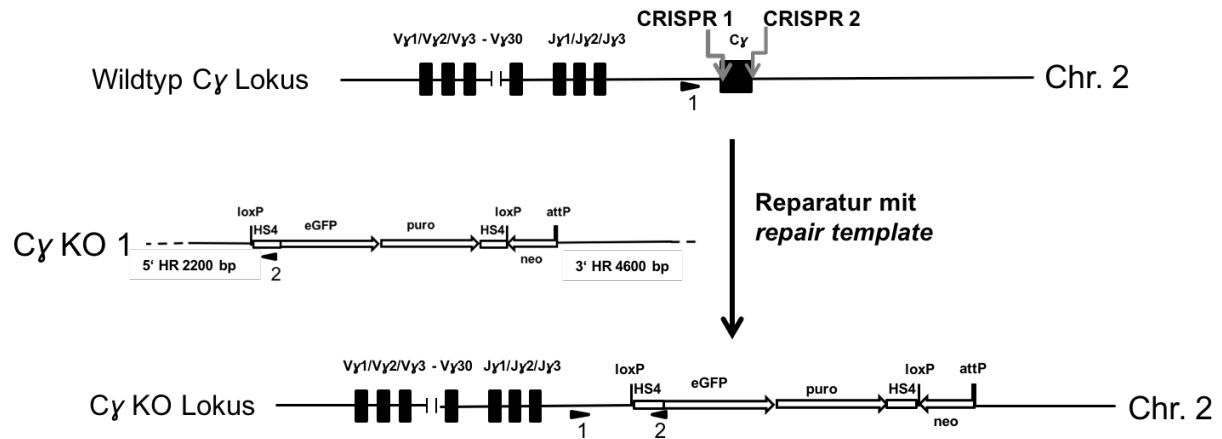


Abbildung 35: Schema des *Cy* Wildtyp Locus und der Reparatur mit *Cy* KO 1 als *repair template* nach durch CRISPR/Cas9-System induzierten Doppelstrangbruch

1 und 2 zeigen Positionen von Primern, die zur Kontrolle der korrekten Integration der Markerkassette in den *Cy* Locus verwendet wurden.

Es wurden mehrere Transfektionen mit keinem, einem oder zwei CRISPR/Cas9-Konstrukten in Kombination mit dem Targeting Vektor *Cy* KO 1 durchgeführt. Ab fünf Tage nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 0,5 µg/ml Puromycin selektiert. Das Screening auf eGFP-positive Zellen erfolgte nach zehn Tagen Selektion. Puromycin-resistente, eGFP-positive Zellen wurden klonal expandiert. Nach Expansion auf 1×10^6 Zellen wurde von 250000 Zellen genomische DNA isoliert und die PCR zur Überprüfung der korrekten Integration des Targeting Vektors in den *Cy* Locus durchgeführt (siehe 5.3.3). Eine Auflistung der durchgeführten Elektroporationen in CB PGCs und des Resultates ist in Tabelle 21 zu sehen.

Zellzahl	<i>Cy</i> KO 1 linearisiert	PX330-sgRNA 1403	PX330-sgRNA 1410	Klone mit positivem Targeting	Klone mit negativem Targeting
5×10^6	10 µg	-	-	0	0
5×10^6	10 µg	10 µg	-	1	0
5×10^6	10 µg	-	10 µg	2	0
5×10^6	10 µg	10 µg	10 µg	1	0

Tabelle 21: Kotransfektionen von *Cy* KO 1 und CRISPR/Cas9-Konstrukten in CB PGCs

Während bei alleiniger Verwendung von *Cy* KO 1 bei einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen kein Klon erhalten wurde, entstanden aus allen Kombinationen von *Cy* KO 1 und den CRISPR/Cas9-Konstrukten PX330-sgRNA 1403 und/oder PX330-sgRNA 1410 jeweils ein oder zwei positive

Klone. Der Nachweis der korrekten Integration des C γ KO 1 Vektors in den C γ Locus per PCR, der für alle Klone positiv war, ist in Abbildung 36 zu sehen.

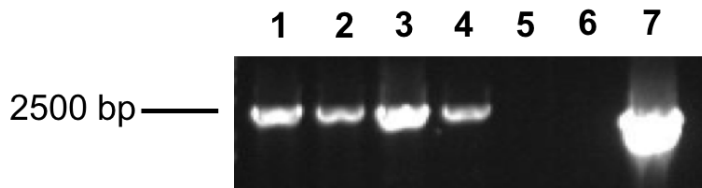


Abbildung 36: PCR Analyse zum Nachweis der korrekten Integration des C γ KO 1 Targeting Vektors

Der sense Primer liegt upstream des 5' Homologie-Armes, der antisense Primer in der selektierbaren Markerkassette. Somit kann nur dann ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (ca. 2500 bp) entstehen, wenn der Vektor an der korrekten Stelle in das Genom integriert wurde.

1) CB PGC transfiziert mit je 10 μ g C γ KO 1 und PX330-sgRNA 1403; 2), 3) CB PGC transfiziert mit je 10 μ g C γ KO 1 und PX330-sgRNA 1410; 4) CB PGC transfiziert mit je 10 μ g C γ KO 1, PX330-sgRNA 1403 und PX330-sgRNA 1410; 5) Negativ Kontrolle: CB PGC untransfiziert; 6) H₂O Kontrolle; 7) Positiv Kontrolle: Konstrukt C γ -KO-positiv Kontrolle (K22)

5.5.2 Klonierung eines Targeting Vektors für *homology directed repair* mit 1000 bp Homologie-Armen

Nachdem C γ KO 1, der Targeting Vektor für homologe Rekombination zur Erhöhung der Targetingeffizienz in CB PGCs erfolgreich mit einem oder zwei CRISPR/Cas9-Konstrukten kombiniert werden konnte, sollte nun versucht werden ob auch kürzere Homologie-Arme ausreichen, um in Kombination mit CRISPR/Cas9 korrektes Targeting herbeizuführen.

Dafür wurde ausgehend von C γ KO 1 ein Targeting Vektor kloniert dessen Homologie-Arme sowohl auf der 5' als auch auf der 3' Seite jeweils 1000 bp lang sind und nicht wie bei C γ KO 1 2236 bp beziehungsweise 4632 bp. Die Basenfolge in den 1000 bp langen Homologie-Armen ist homolog zur entsprechenden Sequenz der CB Linie. Die selektierbare Markerkassette blieb unverändert. Abbildung 37 zeigt ein Schema des Vektors C γ KO 2.

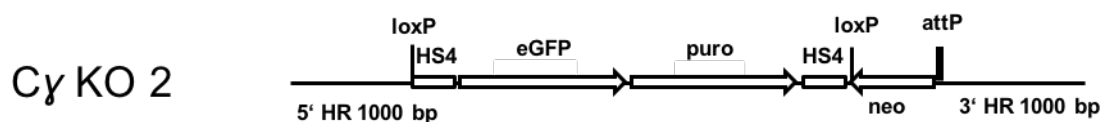


Abbildung 37: Schema von C γ KO 2

Der Targeting Vektor besteht aus einer selektierbaren Markerkassette mit β -Aktin-eGFP und CAG-Puro, flankiert von HS4-Insulator Elementen und LoxP-Stellen. Um später gezielt an diesem Locus Gene einfügen zu können, wurde eine attP-Rekombinationsstelle sowie ein promoterloses Neomycin-Resistenz-Gen eingefügt

Das Konstrukt wurde per Sequenzierung auf seine Korrektheit überprüft und erhielt die Konstrukte-Nummer K73.

5.5.3 Kombination von CRISPR/Cas9-System und C γ KO 2 in CB PGCs

Abbildung 38 zeigt schematisch die Kombination von C γ KO 2 und CRISPR/Cas9-Konstrukten.

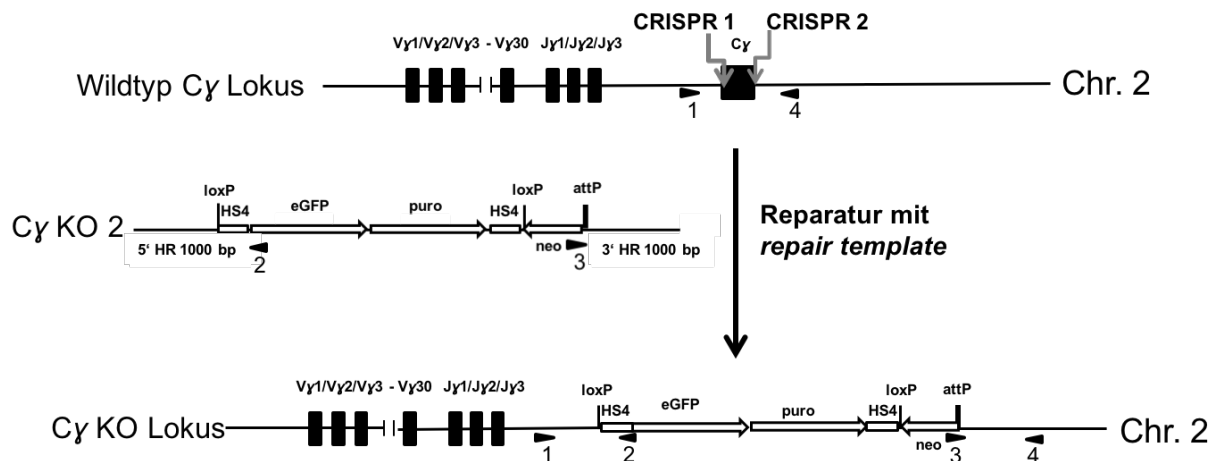


Abbildung 38: Schema des C γ Wildtyp Locus und der Reparatur mit C γ KO 2 als *repair template* nach durch CRISPR/Cas9-System induzierten Doppelstrangbruch

1, 2, 3 und 4 zeigen Positionen von Primern, die zur Kontrolle der korrekten Integration der Markerkassette in den C γ Locus verwendet wurden.

Es wurden mehrere Transfektionen mit keinem, einem oder zwei CRISPR/Cas9-Konstrukten in Kombination mit dem linearisierten Targeting Vektor C γ KO 2 durchgeführt. Ab Tag 5 nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 0,5 μ g/ml Puromycin selektiert. Nach zehn Tagen Selektion wurde nach Puromycin-resistenten, eGFP-positiven Zellen gesucht. Diese wurden klonal expandiert. Nach Erreichen von 1×10^6 Zellen wurde aus 250000 Zellen genomische DNA isoliert und PCR-Reaktionen zur Überprüfung der korrekten Integration des Targeting Vektors in den C γ Locus durchgeführt. Eine Auflistung der durchgeführten Elektroporationen in CB PGCs und des Resultates ist in Tabelle 22 zu sehen.

Zellzahl	Cy KO 2 linearisiert	PX330- sgRNA 1403	PX330- sgRNA 1410	Klone mit positivem Targeting	Klone mit negativem Targeting
5×10^6	10 µg	-	-	0	0
5×10^6	10 µg	10 µg	-	3	0
5×10^6	10 µg	-	10 µg	3	0
5×10^6	10 µg	10 µg	10 µg	2	0

Tabelle 22: Kotransfektionen von Cy KO 2 und CRISPR/Cas9-Konstrukten in CB PGCs

Die korrekte Integration der Markerkassette wurde per PCR getestet. Aufgrund der kürzeren Homologie-Arme konnte nicht nur die PCR über die 5' Homologie-Region verwendet werden, sondern auch eine entsprechende PCR über die 3' Homologie-Region etabliert werden. Abbildung 39 zeigt das Ergebnis beider PCR-Reaktionen. Die verwendeten Primer mit den Primer-Nummern 40, 7, 11 und 48 können Tabelle 6 entnommen werden.

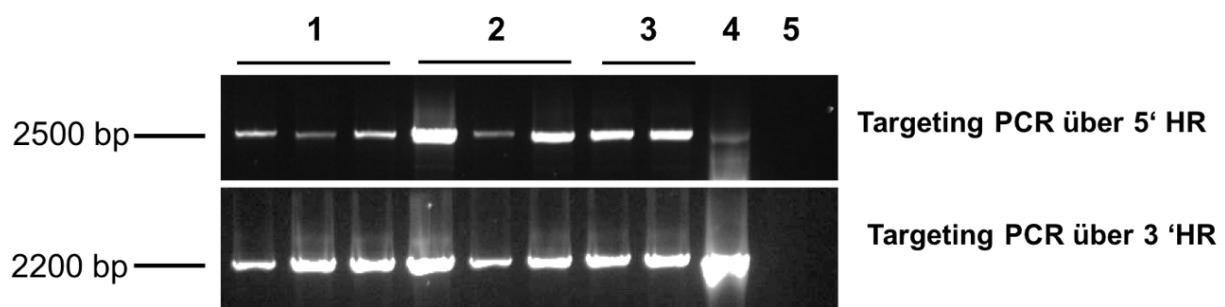


Abbildung 39: PCR zum Nachweis der korrekten Integration der Markerkassette nach Transfektion von Cy KO 2 in CB PGCs

Bei der Targeting PCR über die 5' Homologie-Region (HR) liegt der sense Primer upstream des 5' Homologie-Armes, der antisense Primer in der selektierbaren Markerkassette. Somit kann nur dann ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (ca. 2500 bp) entstehen, wenn der Vektor an der korrekten Stelle ins Genom integriert wurde. Bei der Targeting PCR über die 3' HR liegt der sense Primer in der Markerkassette und der antisense Primer downstream des 3' Homologie-Armes. Das erwartete PCR-Produkt von 2200 bp entsteht folglich nur bei korrekter Integration.

1) CB PGC transfiziert mit je 10 µg Cy KO 2 und PX330-sgRNA 1403; **2)** CB PGC transfiziert mit je 10 µg Cy KO 2 und PX330-sgRNA 1410; **3)** CB PGC transfiziert mit je 10 µg Cy KO 2, PX330-sgRNA 1403 und PX330-sgRNA 1410; **4)** Positiv Kontrolle: Konstrukt Cy KO-positiv Kontrolle (K22) **5)** Negativ Kontrolle: CB PGC untransfiziert

Wurden die Zellen nur mit dem Targeting Vektor Cy KO 2 transfiziert, so konnten keine Klone selektiert werden. Bei Transfektion mit dem Targeting Vektor und PX330-sgRNA 1403 oder PX330-sgRNA 1410 entstanden je drei Klone. Die Verwendung von sowohl dem Targeting Vektor als auch beiden CRISPR/Cas9-Konstrukten brachte zwei positive Klone hervor. Bei allen Klonen hatte die Markerkassette an der korrekten Stelle integriert.

5.6 CRISPR/CAS9-SYSTEM UND HOMOLOGE REKOMBINATION IN LSL PGCS

Nach der erfolgreichen Kombination von $C\gamma$ KO 1 und $C\gamma$ KO 2 mit CRISPR/Cas9-Konstrukten in CB PGCs sollte anschließend die Transfektion in LSL PGCs getestet werden. Da es sich bei der LSL-classic Linie um eine Auszuchtlinie handelt, ist davon auszugehen, dass es Polymorphismen im $C\gamma$ -Gen und den umliegenden Sequenzen gibt und diese nicht vollkommen mit der Sequenz der CB Linie übereinstimmen. Für diese Transfektionen wurden aus Blut gewonnene LSL PGC Linien verwendet.

5.6.1 Kombination von CRISPR/Cas9-System und $C\gamma$ KO 1 in LSL PGCs

Es wurden zwei verschiedene LSL PGC Linien verwendet. Von der Linie 2-7 wurde eine Elektroporation mit 5×10^6 Zellen durchgeführt, von der Linie 2-6 zwei Elektroporationen mit je 5×10^6 Zellen. Aus den Versuchen mit CB PGCs ließ sich kein Vorteil durch die Verwendung beider CRISPR/Cas9-Konstrukte ableiten. Beide CRISPR/Cas9-Konstrukte in Kombination mit dem Targeting Vektor $C\gamma$ KO 1 brachten ähnliche Ergebnisse. Daher wurden nun alle drei Elektroporationen mit je 10 μg linearisiertem $C\gamma$ KO 1 und 10 μg PX330-sgRNA 1410 durchgeführt.

Ab Tag 5 nach der Elektroporation wurden die Zellen über zehn Tage mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin selektiert. Beim Screening auf Puromycin-resistente, eGFP-positive Zellen wurden von der 48-Loch-Flachbodenplatte der Linie 2-7 19 Klone umgesetzt und weiter versorgt. Sieben weitere Klone bestanden aus sehr wenig Zellen, sodass auf Grund der großen Anzahl an Klonen auf eine weitere Expansion verzichtet wurde. Von den beiden 48-Loch-Flachbodenplatten mit elektroporierten Zellen der Linie 2-6 wurden insgesamt 30 Klone umgesetzt und weiter versorgt. Bei weiteren 30 Klonen mit sehr geringer Zellzahl wurde auf ein Umsetzen verzichtet.

Es wurden fünf Klone der Linie 2-6 und sechs Klone der Linie 2-7 expandiert, bis eine ausreichende Zellzahl von 1×10^6 erreicht war. Anschließend wurde aus je 250000 Zellen genomische DNA isoliert und diese per PCR über die 5' Homologie-Region auf korrekte Integration der Markerkassette in den $C\gamma$ Locus getestet. Die übrigen Klone wurden eingefroren, um eventuell später noch einmal auf sie zurückgreifen zu können. Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 40 zu sehen.

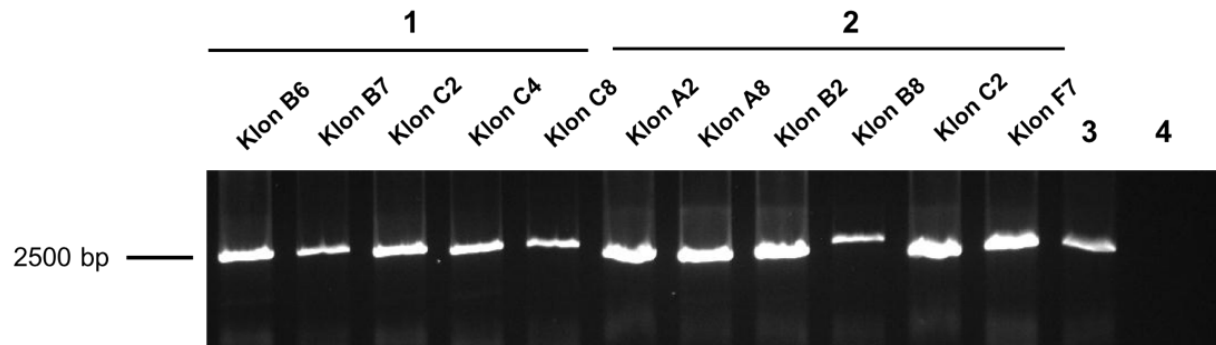


Abbildung 40: PCR zum Nachweis der korrekten Integration der Markerkassette nach Transfektion von $C\gamma$ KO 1 in LSL PGCs

Je 5×10^6 Zellen waren mit 10 μg $C\gamma$ KO 1 und 10 μg PX330-sgRNA 1410 elektroporiert worden. Der sense Primer liegt upstream des 5' Homologie-Armes, der antisense Primer in der selektierbaren Markerkassette. Somit kann nur dann ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (ca. 2500 bp) entstehen, wenn der Vektor an der korrekten Stelle ins Genom integriert wurde.

1) Klone der Linie LSL PGC 2-6; 2) Klone der Linie LSL PGC 2-7; 3) Positiv Kontrolle: Konstrukt $C\gamma$ KO-positiv Kontrolle (K22); 4) Negativ Kontrolle: LSL PGC untransfiziert

Die PCR zeigte, dass bei allen elf getesteten Klone die Markerkassette korrekt in den $C\gamma$ Locus integriert wurde.

5.6.2 Kombination von CRISPR/Cas9 und $C\gamma$ KO 2 in LSL PGCs

Da $C\gamma$ KO 1 auch in LSL PGCs erfolgreich in Kombination mit PX330-sgRNA 1410 eingesetzt werden konnte, wurde als nächstes die Kombination mit $C\gamma$ KO 2 getestet.

Hierfür wurden 5×10^6 LSL PGCs der Linie 2-6 mit je 10 μg linearisiertem $C\gamma$ KO 2 und 10 μg PX330-sgRNA 1410 elektroporiert. Nach zehntägiger Selektion ab Tag 5 nach Elektroporation mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin wurde nach Puromycin-resistenten, eGFP-positiven Zellen gesucht. Es konnte ein Klon detektiert werden. Dieser wurde expandiert und bei Erreichen einer Zellzahl von 1×10^6 wurde genomische DNA aus 250000 Zellen isoliert. Anschließend wurden die PCR-Reaktionen auf korrektes Targeting des $C\gamma$ Locus durchgeführt (siehe 5.5.3). Abbildung 41 zeigt das Ergebnis der PCR-Reaktionen. Bei diesem Zellklon war das Targeting nicht korrekt.

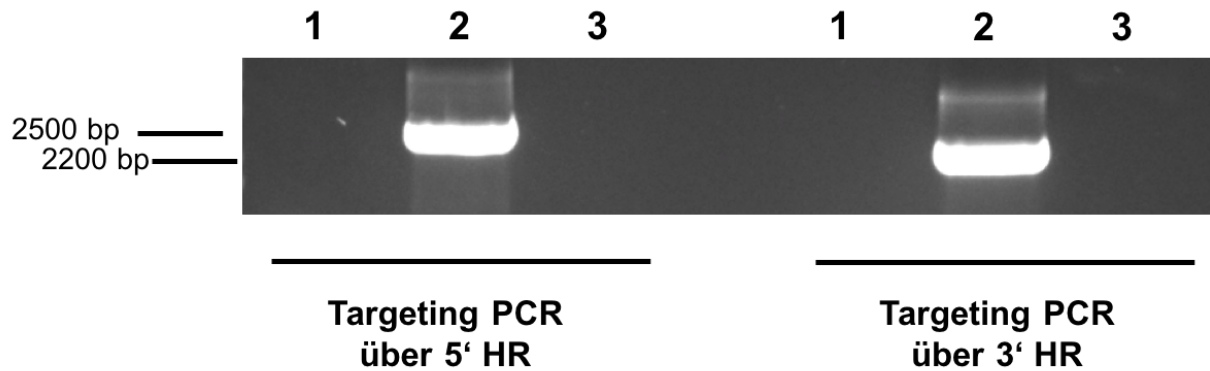


Abbildung 41: PCR zum Nachweis der korrekten Integration der Markerkassette nach Transfektion von C γ KO 2 in LSL PGCs

5×10^6 LSL PGCs der Linie 2-7 wurden mit je 10 μ g C γ KO 2 und 10 μ g PX330-sgRNA 1410 transfiziert. Bei der Targeting PCR über die 5' HR liegt der sense Primer upstream des 5' Homologie-Armes, der antisense Primer in der selektierbaren Markerkassette. Somit kann nur dann ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (ca. 2500 bp) entstehen, wenn der Vektor an der korrekten Stelle ins Genom integriert wurde. Bei der Targeting PCR über die 3' HR liegt der sense Primer in der Markerkassette und der antisense Primer downstream des 3' Homologie-Armes. Das erwartete PCR-Produkt von 2200 bp entsteht folglich nur bei korrekter Integration.

1) LSL PGC 2-6 transfiziert mit je 10 μ g C γ KO 2 und PX330-sgRNA 1410; 2) Positiv Kontrolle: Konstrukt C γ KO-positiv Kontrolle (K22); 3) Negativ Kontrolle: LSL PGC untransfiziert

5.7 GENERIERUNG VON TRANSGENEN HÜHNERN MIT EINEM KNOCK-OUT DES C γ -GENS

Nach der erfolgreichen Etablierung von PGC Linien mit einem Knock-out des C γ -Gens wurden diese Zellen genutzt, um an der Erstellung einer transgenen Hühnerlinie zu arbeiten.

5.7.1 Generierung von Keimbahn-Chimären mit CB PGC C γ KO 3F6

Die unter 5.3.3 erstellte Zelllinie CB PGC C γ KO 3F6 wurde verwendet, um Keimbahn-Chimären zu generieren. Das Vorgehen entsprach dem unter 5.2.3 beschriebenen. Tabelle 23 zeigt die Anzahl der erfolgreich injizierten und transferierten Embryonen sowie die Anzahl der geschlüpften und aufgezogenen Chimären.

Nach Geschlechtsbestimmung per PCR mit für W- und Z- Chromosom spezifischen Primern wurden die weiblichen Chimären euthanasiert. Um die Besiedlung der Gonaden mit den injizierten PGCs zu beurteilen, wurde von insgesamt zehn beim Schlupf verstorbenen Küken oder euthanasierten weiblichen Tieren die Gonaden präpariert und diese auf Besiedelung mit eGFP-positiven Zellen untersucht. Die Effizienz der Besiedelung der Gonaden wurde auf 0 bis 15 % geschätzt. Sechs männliche Chimären wurden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen.

Zelllinie	Injizierte und transferierte Embryonen	Geschlüpfte Chimären (♂ und ♀)	Aufgezogene Keimbahn- Chimären (♂)
CB PGC C γ KO 3F6	51	19	6

Tabelle 23: Übersicht über die Injektionen von CB PGC C γ KO 3F6 in LSL-classic Embryonen

5.7.1.1 Test der CB PGC C γ KO 3F6 Keimbahn-Chimären auf Keimbahn-Transmission

Nach Erreichen der Geschlechtsreife wurden die männlichen Keimbahn-Chimären auf Keimbahn-Transmission überprüft. Das Vorgehen entsprach grundsätzlich dem unter 5.2.3.1 beschriebenen. Für die PCR-Reaktionen zur Testung des Spermas auf transgene Anteile wurden Primer verwendet, die für das eGFP-Gen, das Puromycin-Resistenz-Gen oder den CAG-Promoter spezifisch sind. Des Weiteren wurde das Primerpaar verwendet welches über die 5'HR des Targeting Vektors amplifiziert und so die korrekte Integration der Markerkassette in den C γ Locus nachweist. Insgesamt wurde Sperma von sechs CB PGC C γ KO 3F6 Chimären getestet.

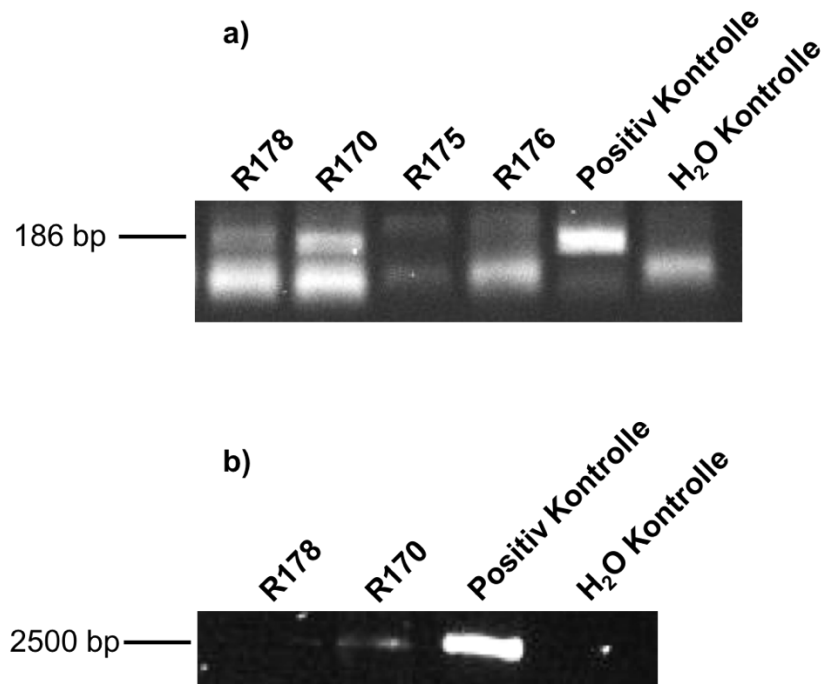


Abbildung 42: PCR zum Nachweis transgener Anteile im Sperma von CB PGC C γ KO Chimären

Genomische DNA aus Sperma von CB PGC C γ KO 3F6 Chimären wurde per PCR auf transgene Anteile untersucht. a) eGFP-Gen spezifische Primer wurden zum Nachweis der Markerkassette verwendet. Erwartet wurde eine Bande in Höhe von 186 bp. b) Primer über die 5' HR des Targeting Vektors wurden zum Nachweis der korrekten Integrationsstelle der Markerkassette in den C γ Locus verwendet. Erwartet wurde eine Bande in Höhe von 2500 bp.

Die Chimäre R170 testete in den PCR-Reaktionen positiv für das eGFP-Gen und die korrekte Integration der Markerkassette in den C γ Locus. Dieser Hahn wurde mit sechs LSL-classic Hennen angepaart. Die Eier wurden gesammelt und inkubiert. Sechs bis sieben Tage alte Embryonen wurden auf eGFP Expression überprüft (siehe Tabelle 24). Es konnte keine Keimbahn-Transmission nachgewiesen werden.

Zelllinie	Hahn	Überprüfte Embryonen	Positive Embryonen
CB PGC C γ KO 3F6	R170	451	0

Tabelle 24: Keimbahn-Transmissionsraten von CB PGC C γ KO 3F6 Keimbahn-Chimäre R170

5.7.2 Generierung von Keimbahn-Chimären mit LSL PGC C γ KO Linien

Da keine Keimbahn-Transmission für die CB PGC C γ KO 3F6 Chimären nachgewiesen werden konnte und auch die Erstellung von mCherry Hühnern bei Verwendung von CB PGCs nicht erfolgreich war, wurde der Entschluss gefasst mit LSL PGC Linien weiter zu arbeiten.

Fünf der unter 5.6.1 erstellten LSL PGC C γ KO Linien wurden zur Erstellung von Keimbahn-Chimären verwendet. Vier davon entstammen der LSL PGC Elternlinie 2-7, da diese nach der Erstellung in größerer Zellzahl eingefroren und daher schneller für die Injektionen expandiert werden konnten. Eine der injizierten Zelllinien entstammte der LSL PGC Elternlinie 2-6. Die Generierung der Chimären geschah wie bei Punkt 5.2.3 beschrieben. Tabelle 25 zeigt eine Übersicht der zur Injektion in Embryonen verwendeten Zelllinien sowie der nachfolgend geschlüpften und aufgezogenen Chimären.

Zelllinie	Injizierte und transferierte Embryonen	Geschlüpfte Chimären (♂ und ♀)	Aufgezogene Keimbahn-Chimären (♂)
LSL PGC 2-7 C γ KO B8	62	47	10
LSL PGC 2-7 C γ KO C2	61	49	12
LSL PGC 2-7 C γ KO B2	54	43	9
LSL PGC 2-7 C γ KO F7	58	49	12
LSL PGC 2-6 C γ KO C2	69	59	13

Tabelle 25: Übersicht über die Injektionen von LSL PGC C γ KO Linien in LSL-classic Embryonen

Auf die Geschlechtsbestimmung per PCR mit W- und Z-Chromosom spezifischen Primern folgte die Euthanasie der weiblichen Küken im Alter von etwa fünf Tagen. Um die Besiedelung der Gonaden durch die injizierten PGCs beurteilen zu können, wurden die Gonaden von beim Schlupf verstorbenen Küken oder euthanasierten weiblichen Küken präpariert und unter dem Fluoreszenzmikroskop bewertet. Es wurden die Gonaden von 22 Chimären der Linie LSL PGC 2-7 C γ KO B8, 25 Chimären der Linie LSL PGC 2-7 C γ KO C2, 19 Chimären der Linie LSL PGC 2-7 C γ KO B2, 16 Chimären der Linie LSL PGC 2-7 C γ KO F7 und von 18 Chimären der Linie LSL PGC 2-6 C γ KO C2 präpariert und auf Besiedelung mit eGFP-positiven Zellen überprüft.

Abbildung 43 zeigt Beispielbilder für Gonaden von weiblichen Chimären der fünf verwendeten LSL PGC C γ KO Linien. Die Effizienz der Gonaden-Besiedelung wurde für LSL PGC 2-7 C γ KO B8 auf 0-40 % geschätzt, für LSL 2-7 PGC C γ KO C2 auf 0-30 %, für LSL 2-7 PGC C γ KO B2 auf 0-40 %, für LSL PGC 2-7 C γ KO F7 auf 0-50 % und für LSL PGC 2-6 C γ KO C2 auf 0-80 %.

Zehn männliche Keimbahn-Chimären der Linie LSL PGC 2-7 C γ KO B8, zwölf der Linie LSL PGC 2-7 C γ KO C2, neun der Linie LSL PGC 2-7 C γ KO B2, zwölf der Linie LSL PGC 2-7 C γ KO F7 und 13 der Linie LSL PGC 2-6 C γ KO C2 wurden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen.

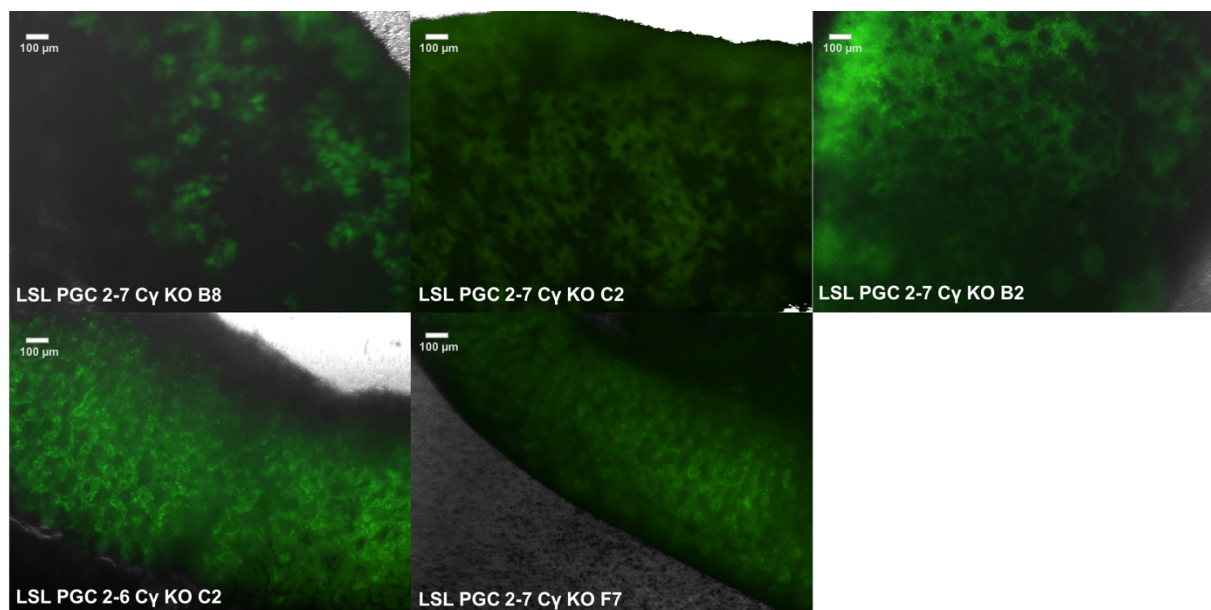


Abbildung 43: Kolonisation von Gonaden mit LSL PGC C γ KO

Gonaden von weiblichen Chimären nach Injektion mit LSL PGC C γ KO Linien. Die Bilder wurden in vierfacher Vergrößerung aufgenommen.

5.7.2.1 Test der LSL PGC C γ KO Keimbahn-Chimären auf Keimbahn-Transmission

Nach Erreichen der Geschlechtsreife wurden männliche LSL PGC C γ KO Chimären mit je wenigstens vier LSL-classic Hennen angepaart. Die Eier wurden gesammelt und für sechs bis sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen auf eGFP Expression untersucht. Tabelle 26 zeigt eine Übersicht über die so getesteten Keimbahn-Chimären und ihre Keimbahn-Transmissionsraten. Die Chimären LSL PGC 2-7 C γ KO C2 R101, LSL PGC 2-7 C γ KO B2 R338, LSL PGC 2-7 C γ KO B2 R335, LSL PGC 2-6 C γ KO C2 R341, LSL PGC 2-6 C γ KO

C2 R361 und LSL PGC 2-6 C γ KO C2 R370 zeigten Keimbahn-Transmission. Für die übrigen getesteten Hähne konnte keine Keimbahn-Transmission nachgewiesen werden. Es wurden Chimären von vier der fünf injizierten LSL PGC C γ KO Linien auf Keimbahn-Transmission untersucht.

Zelllinie	Hahn	Überprüfte Embryonen	Positive Embryonen
LSL PGC 2-7 C γ KO B8	R033	74	0
	R034	74	0
	R050	54	0
LSL PGC 2-7 C γ KO C2	R101	38	2
	R001	47	0
	R036	40	0
	R049	46	0
LSL PGC 2-7 C γ KO B2	R330	45	0
	R335	45	1
	R338	53	1
LSL PGC 2-6 C γ KO C2	R341	5	1
	R350	64	0
	R361	5	1
	R366	39	0
	R370	44	2
Gesamt		673	8

Tabelle 26: Keimbahn-Transmissionsraten von LSL PGC C γ KO Keimbahn-Chimären

Von den eGFP-positiven Embryonen wurde genomische DNA isoliert und eine PCR zur Überprüfung der korrekten Integration der Markerkassette in den C γ Lokus durchgeführt. Die positiven Embryonen waren lebendig und gleich weit entwickelt wie entsprechende eGFP negative Embryonen. Abbildung 44 zeigt einen eGFP-positiven Embryo sowie den erfolgreichen Nachweis der korrekten Integrationsstelle der Markerkassette per PCR.

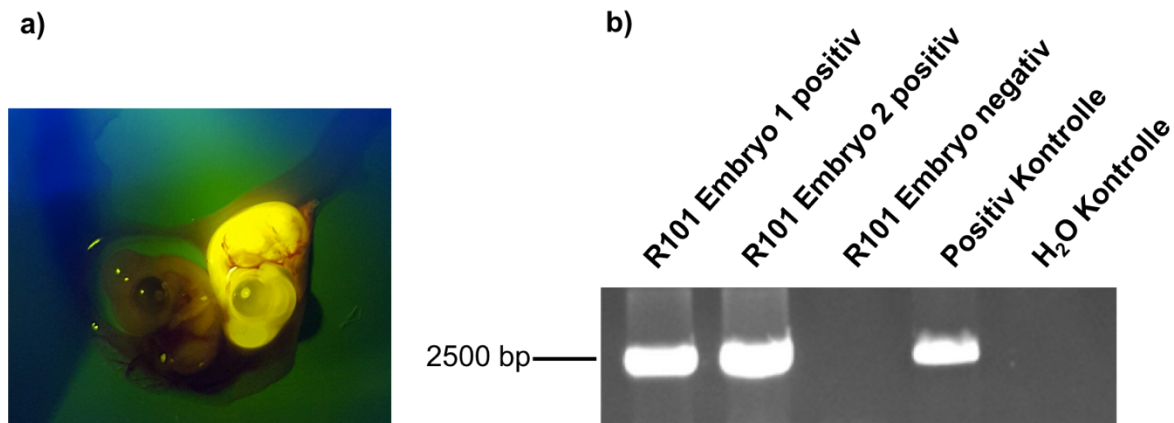


Abbildung 44: Erfolgreiche Keimbahn-Transmission von LSL PGC 2-7 C γ KO C2 Chimäre R101

a) Bild eines eGFP-positiven und eines gleichalten eGFP-negativen Embryos. **b)** Genomische DNA wurde von eGFP-positiven sowie eGFP-negativen Embryonen isoliert, um sie per PCR auf die korrekte Integration der Markerkassette in den C γ Lokus zu überprüfen. Die erwartete Bandengröße lag bei 2500 bp. Als positiv Kontrolle wurde das Konstrukt C γ KO-positiv Kontrolle (K22) verwendet, eine H₂O Kontrolle diente als negativ Probe.

Eier von Chimären mit nachgewiesener Keimbahn-Transmission wurden bis zum Schlupf inkubiert. Geschlüpfte Küken wurden auf eGFP Expression untersucht. Eine Übersicht über die geschlüpften und untersuchten Küken ist in Tabelle 27 zu sehen. Aus Blut von eGFP-positiven Küken wurde genomische DNA isoliert und per PCR die korrekte Integration der Markerkassette in den C γ Lokus getestet. Als negativ Kontrolle wurde genomische DNA eGFP-negativer gleichaltriger Küken verwendet. Diese PCR war für eGFP-positive Küken positiv, wie in Abbildung 45 zu sehen. Die positiven Küken waren phänotypisch gesund und entwickelten sich gleichmäßig in Vergleich zu nicht transgenen, gleichalten Geschwistertieren.

Zelllinie	Hahn	Geschlüpfte Küken	Positive Küken
LSL PGC 2-7 C γ KO C2	R101	475	19
LSL PGC 2-7 C γ KO B2	R338	78	1
LSL PGC 2-6 C γ KO C2	R341	109	7
	R361	121	2
Gesamt		783	29

Tabelle 27: Geschlüpfte Küken von LSL PGC C γ KO Chimären mit nachgewiesener Keimbahn-Transmission

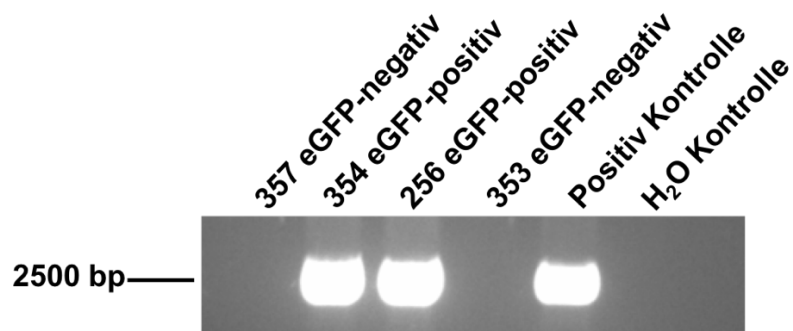


Abbildung 45: PCR-Nachweis der korrekten Integration der Markerkassette in den C γ Locus bei eGFP-positiver Nachzucht von LSL PGC 2-7 C γ KO C2 Chimäre R149

Genomische DNA wurde aus dem Blut von zwei eGFP-positiven und zwei eGFP-negativen positiven Geschwistertieren aus Anpaarung der Chimäre R101 mit LSL Hennen gewonnen. Eine PCR zum Nachweis der korrekten Integration der selektierbaren Markerkassette wurde durchgeführt. Es wurde eine Bande auf Höhe von 2.500 bp erwartet. Als positiv Kontrolle wurde das Konstrukt C γ KO-positiv Kontrolle (K22) verwendet, eine H₂O Kontrolle diente als negativ Probe.

6. DISKUSSION

Neben seiner Bedeutung als landwirtschaftliches Nutztier ist das Huhn auch ein hervorragendes Modelltier für die Forschung, beispielsweise im Bereich der Entwicklungsbiologie und der Immunologie [102, 112]. Allerdings wurde die Nutzbarkeit des Huhns für die Wissenschaft stark eingeschränkt, da im Vergleich zum Säuger die Erstellung genetisch veränderter Tiermodelle nicht oder nur eingeschränkt realisierbar war [102, 155].

Genetisch modifizierte Hühner könnten zukünftig eine bedeutende Rolle nicht nur für die Forschung und für die Herstellung rekombinanter therapeutischer Proteine, sondern durch die Etablierung krankheitsresistenter Linien auch für die Agrarwirtschaft spielen. Lange Zeit war es vorwiegend auf Grund der Reproduktionsphysiologie der Vögel nicht oder nur unter großem Aufwand möglich, Veränderungen am Hühnergenom vorzunehmen. In den letzten Jahren gab es auf diesem Gebiet jedoch große Fortschritte.

6.1 GEWINNUNG VON PGC LINIEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM GENETISCHEM HINTERGRUND

Zu den wichtigsten Entwicklungen bei der genetischen Modifikation von Hühnern gehört zweifellos die Etablierung von PGC-Kulturen sowie die Möglichkeit diese genetisch zu verändern und zur Generierung von Keimbahn-Chimären zu verwenden [88]. Die Verfügbarkeit embryonaler Stammzelllinien von Mäusen ermöglicht seit einigen Jahrzehnten die gezielte genetische Modifikation *in vitro*. Von Hühnerembryonen gewonnene Stammzelllinien zeigten einen vergleichbaren Phänotyp, leisteten jedoch keinen Beitrag zur Keimbahn [156]. Die Transplantation blastodermaler Zellen zwischen Stadium X Embryonen [86] kann zur Generierung von Keimbahn-Chimären verwendet werden, da auch PGCs unter den undifferenzierten Blastoderm-Zellen vorhanden sind [157, 158]. PGCs sind die Vorläufer der Spermien und Eizellen. Sie können sich nicht zu somatischen Geweben differenzieren, behalten jedoch auch nach längerer Kultivierung die Fähigkeit sich zu befruchtungsfähigen Spermien oder Eizellen zu differenzieren [88]. Dadurch können in PGCs *in vitro* Gene sowohl zufällig integriert als auch gezielt verändert werden. Zur Effizienzsteigerung bei zufälliger Integration können phiC31 Integrase-mediierte attB-attP Rekombination [101] oder Transposons [106, 110] verwendet werden. Bei der Verwendung von attB-attP Rekombination werden die transfizierten Gene überwiegend in repetitiven DNA-Sequenzen integriert, weshalb eine Beeinträchtigung von Wirtsgenen wenig wahrscheinlich ist [101]. Um im Rahmen dieser Arbeit das mCherry-Gen unter einem ubiquitären Promoter in das Hühnergenom einzufügen

wurde attB-attP Rekombination verwendet. Die Verwendung von Transposons als Vektoren ermöglicht hohe Transfektions- und Integrationsfrequenzen [106, 110], von Nachteil sind die zufällige Integration des Transgens sowie das Hinterlassen von genetischer Information der verwendeten Vektoren [75]. Beim Huhn ist bisher keine Entsprechung des Rosa26 Locus bekannt, der bei Mäusen häufig gezielt zum Einfügen von Genen für die stabile ubiquitäre Expression verwendet wird, wobei endogene Gene nicht beeinträchtigt werden [159]. Entsprechende Loci wurden mittlerweile auch bei anderen Spezies wie Mensch [160], Ratte [161], Kaninchen [162] und Schwein [163] identifiziert. Sollte dies auch beim Huhn gelingen, so könnte die Integration an diesen Locus zukünftig die zufällige Integration von Genen ersetzen.

Die Modifikation von PGCs stellt bisher die einzige Möglichkeit dar gezielte Veränderungen am Hühnergenom vorzunehmen oder gezielt Gene auszuschalten, wie beispielsweise bei der Generierung von Hühnerlinien mit einem Knock-out des J_H -Gens [112] oder des Immunglobulin leichte Ketten Locus [117]. Möglicherweise könnten PGCs *in vivo* gezielt durch sequenzspezifische Nukleasen modifiziert werden, entsprechend zur Injektion von Transposons in das Blutgefäßsystem von Embryonen durch Tyack et al. [111]. In der Studie von Tyack et al. wurde jedoch nur eine geringe Keimbahn-Transmission erreicht [111]. Außerdem ermöglicht dieses Vorgehen nicht die Selektion von PGC Linien mit den gewünschten, definierten Veränderungen. Daher wurden in dieser Arbeit kultivierte PGCs verwendet, um das $C\gamma$ -Gen im Hühnergenom zu deletieren. Die Verwendung von PGC-Kulturen hat den Vorteil, dass vorgenommene Modifikationen *in vitro* überprüft werden können [145], bevor die Veränderungen auf das Tier übertragen werden.

In der Literatur sind drei verschiedene Möglichkeiten beschrieben, PGCs aus Embryonen zu gewinnen und anschließend zu kultivieren: Die Isolierung aus Germinal Crescent, aus embryonalem Blut und aus embryonalen Gonaden [90, 95, 96, 99, 103]. In der vorliegenden Arbeit wurden alle drei Methoden erfolgreich angewandt, um PGC Linien unterschiedlicher Hühnerlinien zu gewinnen. Grundsätzlich zeigten alle PGC Linien einen vergleichbaren Phänotyp und ein ähnliches Wachstumsverhalten. Lediglich die aus Germinal Crescent der CB Hühnerlinie gewonnenen PGCs wuchsen tendenziell langsamer und etwas klumpig. Da mit derselben Methode gewonnene PGCs der eGFP Hühnerlinie 165-2 unauffällig waren, ist dies wahrscheinlich auf den genetischen Hintergrund der CB PGCs und nicht auf die Isolierungsmethode zurückzuführen. In dieser Arbeit konnte Keimbahn-Transmission mit PGCs aus Germinal Crescent, Blut und Gonaden erreicht werden.

Durch die Verwendung der ingezüchteten CB Hühnerlinie [150] sollten isogene transgene Hühnerlinien erstellt werden. Dadurch sollten zukünftige Experimente, die beispielsweise adoptive Transferexperimente beinhalten, ermöglicht werden. Durch die Verwendung von isogenen Tieren mit übereinstimmender MHC Expression sind keine Abstoßungsreaktionen zu befürchten. Allerdings traten bei den Arbeiten mit der CB Hühnerlinie verschiedene Schwierigkeiten auf. Bei den zur Isolierung von PGCs verwendeten CB Embryonen fiel auf, dass diese in ihrer Entwicklung teilweise sehr unterschiedlich waren, wodurch die Isolierung der PGCs erschwert wurde. Zusätzlich sind Bruteier dieser Hühnerlinie nur saisonal und in begrenzter Anzahl erhältlich. Die Tiere der CB Linie konnten nicht erfolgreich in den Tierhaltungseinrichtungen des Instituts für Tierphysiologie der LMU München gehalten werden. In der Volierenhaltung hatten die Tiere Probleme mit Gesundheit und Fitness, eine Nachzucht durch natürliche Anpaarung war nicht möglich. Daher wurde aus Gründen des Tierschutzes auf eine weitere Haltung der CB Hühner verzichtet. Mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden konnte bei der Verwendung von CB PGCs nur eine sehr niedrige Keimbahn-Transmission erreicht werden. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die CB PGCs nur schwer in der Lage sind, mit den „fitteren“ endogenen PGCs der ausgezüchteten Rezipienten-Embryonen zu konkurrieren. Um dieses Problem zu beheben, könnten die modifizierten CB PGCs in CB Rezipienten-Embryonen injiziert werden. Erschwert wird dieser Ansatz wiederum durch die ungleichmäßige Entwicklung der CB Embryonen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung von Embryonen ohne endogene PGCs oder mit beispielsweise durch Bestrahlung reduzierten Anzahl endogener PGCs [76]. Aufgrund der genannten Probleme wurde nach einigen Versuchen mit CB PGCs die Verwendung dieser Hühnerlinie vorerst eingestellt und ein alternativer Ansatz gewählt, bei dem PGCs der ausgezüchteten Legelinie LSL-classic eingesetzt wurden.

Es gibt neben der Modifikation von PGCs noch weitere Methoden, um Veränderungen am Hühnergenom vorzunehmen. Durch das von McGrew et al. genutzte lentivirale Vektorsystem lassen sich effizient Fremdgene einfügen, wobei Keimbahn-Transmissionsraten von 4-45 % erreicht wurden [84]. Jedoch ist die Größe der Gene, die eingefügt werden können, begrenzt, bei replikations-defizienten Viren auf maximal 10 kb, was je nach Anwendung ein Problem darstellen kann [164]. Die Integration ins Wirtsgenom erfolgt zufällig, wodurch es zu einer unerwünschten Beeinträchtigung endogener Gene kommen kann [78, 101]. Zusätzlich zum erwünschten Fremdgen werden auch Bestandteile viraler DNA integriert [78]. Das lentivirale Vektorsystem wäre prinzipiell zum Einfügen von Genen wie des mCherry-Gens geeignet. Dennoch sollten in dieser Arbeit PGCs zur Generierung einer Hühnerlinie mit ubiquitärer

mCherry Expression verwendet werden, da dieses Teilprojekt neben dem späteren experimentellen Einsatz der mCherry-positiven Hühner auch der Etablierung der benötigten Fertigkeiten bei der Erstellung von Keimbahn-Chimären unter Verwendung modifizierter PGCs diene. Das Deletieren von Genen oder das gezielte Ausschalten von Genfunktionen ist mit Hilfe retroviraler Vektorsysteme nicht möglich.

Love et al. veröffentlichten 1994 die Generierung genetisch modifizierter Hühner durch Mikroinjektion von DNA in den Pronukleus der Keimzelle [78]. Der Vorteil dieser Methode liegt in der unbegrenzten Größe des DNA-Moleküls, das eingefügt werden kann [78]. Jedoch erfolgt auch hier eine zufällige Integration des Fremdgens und der Arbeitsaufwand, um an Eier im geeigneten Entwicklungsstadium zu gelangen, ist groß. Legehennen müssen zur Entnahme des noch schalenlosen Eies im Ovidukt etwa zweieinhalb Stunden nach der letzten Eiablage euthanasiert werden [78, 165]. Das Vornehmen eines Knock-outs ist ebenfalls nicht möglich. Aufgrund der genannten Nachteile erschien die Methode als ungeeignet für diese Arbeit. Möglicherweise könnte die Mikroinjektion von DNA in den Pronukleus der Keimzelle mit mittlerweile etablierten *gene targeting* Methoden wie sequenzspezifischen Nukleasen kombiniert werden, um gezielte Genmodifikationen herbeizuführen.

6.2 GENERIERUNG GENETISCH MODIFIZIERTER HÜHNER MIT UBIQUITÄRER mCHERRY EXPRESSION

Fluoreszierende Proteine werden in der Biotechnologie als Marker eingesetzt, um beispielsweise das Screening nach transgenen Tieren zu erleichtern, aber auch um spezifische Zelltypen zu markieren oder die Genexpression in Tiermodellen zu erforschen [166]. Am häufigsten werden dabei grün fluoreszierende Proteine wie GFP und eGFP verwendet [166]. Bei der Generierung transgener Hühner dienen fluoreszierende Proteine als Marker für erfolgreich transfizierte Zellen und zur Sichtbarmachung der Gonaden-Besiedlung [103]. Durch die Expression eines fluoreszierenden Proteins ist außerdem das Screening von Embryonen und geschlüpften Küken erleichtert [103]. Daher wurden GFP und eGFP bei der Generierung verschiedener transgener Hühnerlinien verwendet [88, 106, 112]. Außerdem können Zellen von GFP- oder eGFP-positiven Hühnern für Transferexperimente in Hühner eingesetzt werden, die keine Fluoreszenzproteine exprimieren.

Für bestimmte Anwendungen, wie beispielsweise *in vivo imaging*, sind Fluoreszenzproteine mit größeren Emissions-Wellenlängen, etwa rot fluoreszierende Proteine, besser geeignet, da

Licht mit längeren Wellen weniger stark vom Gewebe absorbiert wird [167]. Die Eignung von eGFP für *in vivo imaging* wird weiterhin durch das Auftreten von Autofluoreszenz im selben Spektrum verringert [168]. mCherry ist ein monomeres rot fluoreszierendes Protein (RFP), das sich im Vergleich zu anderen monomeren RFPs durch eine kräftige Farbe, geringe Toxizität und gute Photostabilität auszeichnet [169]. So zeigen Mäuse mit ubiquitärer mCherry Expression keine gesundheitlichen oder sonstige Auffälligkeiten [166]. Neben ihrer Eignung für *in vivo imaging* können Zellen von Hühnern mit ubiquitärer mCherry Expression auch für adoptive Transferexperimente sowohl in Wildtyp- als auch in eGFP-positive Hühner verwendet werden. Die transferierten Zellen können anschließend wiederum über *in vivo imaging* Verfahren sichtbar gemacht werden.

Zur Generierung transgener Hühner mit ubiquitärer mCherry Expression wurde ein Konstrukt kloniert, in dem das mCherry-Gen unter einem Hühner- β -Aktin-Promoter exprimiert wird. Zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen ist ein Puromycin-Resistenz-Gen unter einem CAG-Promoter eingefügt. Diese selektierbare Markerkassette ist durch HS4-Insulatoren flankiert, die möglicherweise epigenetisches Silencing verringern können (siehe 5.2.1) [101]. Leighton et al. zeigten, dass durch die Verwendung von HS4-Insulatoren die Frequenz selektierbarer Klone nach Transfektion von PGCs erhöht wurde [101], während bei der Verwendung von Transposons als Vektoren durch Macdonald et al. kein Vorteil durch das Einfügen von HS4-Insulatoren entstand [106]. Die im Konstrukt enthaltene attB-Rekombinationsstelle dient der sequenzspezifischen Rekombination mit pseudo-attP-Rekombinationsstellen im Hühnergenom. Zu diesem Zweck wurde das mCherry-attB Konstrukt mit einem Expressionskonstrukt für phiC31 Integrase kotransfiziert, wodurch die Integrationsfrequenz erhöht werden kann [101]. Zur Erstellung mCherry-positiver PGC Linien wurden Elektroporationen in CB PGCs und LSL PGCs durchgeführt. Die Effizienz lag bei vier beziehungsweise sechs Klonen in je 5×10^6 Zellen und damit niedriger als durch Leighton et al. beschrieben [101]. Der Grund für diese niedrigere Effizienz könnte in einer schlechteren Transfizierbarkeit der verwendeten PGC Linien liegen. Die Transfizierbarkeit kann durch den genetischen Hintergrund der PGC Linien beeinflusst sein. Außerdem wurde im Gegensatz zu Leighton et al. in dieser Arbeit ein *feeder* Zell freies Kultursystem zur Kultivierung der PGCs verwendet [89], was ebenfalls Einfluss auf die Modifizierbarkeit der Zellen haben kann. Des Weiteren kann die Qualität der verwendeten DNA eine Rolle spielen.

mCherry-positive CB PGC Linien und mCherry-positive LSL PGC Linien wurden zur Generierung von Keimbahn-Chimären verwendet. Nach Injektion in das Gefäßsystem von H&H Stadium 14 Embryonen konnte für alle injizierten mCherry PGC Linien eine

Kolonisation der Gonaden nachgewiesen werden. Das Schätzen der Kolonisation ist ein subjektives Verfahren, welches nach Möglichkeit präzisiert wurde, indem es immer von derselben Person durchgeführt wurde [103]. Dabei zeigten die beiden verwendeten mCherry CB PGC Linien eine schlechtere Kolonisation als die drei verwendeten mCherry LSL PGC Linien (siehe 5.2.3 und 5.2.5). Mögliche Ursachen für die schlechtere Kolonisation durch die CB PGCs könnten unter anderem in nicht optimal durchgeführten Injektionen vermutet werden. Da die Kolonisation durch CB PGC Linien aber auch bei anderen Experimenten niedrig war (nicht veröffentlichte Versuche) und die Injektionen der LSL PGCs durch dieselbe Person durchgeführt wurden, sind die CB PGCs vermutlich auf Grund ihres ingezüchteten Hintergrunds schlechter in der Lage die Gonaden zu kolonisieren. Außerdem wurden die verwendeten LSL PGC Linien aus embryonalen Gonaden, die verwendeten CB PGC Linien aus Germinal Crescent isoliert. Song et al. beobachteten ebenfalls, dass aus Gonaden stammende PGC Linien eine bessere Kolonisation zeigten als aus Germinal Crescent stammende PGC Linien [100]. In Bezug auf die Keimbahn-Transmission ergab sich in dieser Studie kein Vorteil aus der Verwendung von Gonaden PGC Linien [100]. Die verbesserte Schlupfrate nach Injektion der mCherry LSL PGCs im Vergleich zu den mCherry CB PGCs ist auf ein optimiertes Management und eine engmaschigere Überwachung der schlüpfenden Küken im Laufe des Projekts zurückführbar.

Zur Überprüfung der Keimbahn-Transmission wurde das Sperma von CB PGC mCherry Chimären per PCR auf das Vorhandensein des mCherry-Gens untersucht. Männliche Keimbahn-Chimären wurden mit Wildtyp Hennen angepaart und sechs bis sieben Tage alte Embryonen auf die Expression von mCherry untersucht. Rot fluoreszierende Embryonen wurden zusätzlich per PCR auf das mCherry-Gen getestet.

Das Screening von Embryonen aus Anpaarungen zwischen Chimären und Wildtyp Hennen ist ein genaues Verfahren zur Ermittlung der Keimbahn-Transmission. Jedoch ist die Methode arbeitsintensiv und es werden zahlreiche Hennen und auch Volieren benötigt, wenn eine größere Anzahl Keimbahn-Chimären getestet werden soll. Außerdem wird dabei eine große Anzahl Embryonen getötet, auch wenn dies vor der Entwicklung des Schmerzempfindens ab Inkubationstag 10,5 geschieht [170]. Daher könnten bei zukünftigen Projekten alternative Verfahren untersucht werden, um Keimbahn-Chimären mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für Keimbahn-Transmission zu selektieren. Durch quantitative Methoden wie Durchflusszytometrie oder quantitative Real Time PCR können die Keimbahn-Chimären mit den höchsten Anteilen transgener Spermien detektiert werden [111, 171]. Jedoch kann mit den genannten Methoden nicht sichergestellt werden, dass die detektierten transgenen Zellen

tatsächlich fertil sind. So konnte auch mit den in dieser Arbeit durchgeführten PCRs auf genomischer DNA aus Sperma der Keimbahn-Chimären keine zuverlässige Korrelation zwischen positivem PCR-Ergebnis und positiver Keimbahn-Transmission erreicht werden. Durch die Anpaarung der Chimären und die Untersuchung von Embryonen kann vor der Inkubation einer größeren Anzahl von Eiern bis zum Schlupf die Fruchtbarkeit der transgenen Spermien und die Entwicklungsfähigkeit der genetisch modifizierten Embryonen nachgewiesen werden.

Von insgesamt 1472 untersuchten Embryonen aus Anpaarungen mit auf Grund positiver PCR-Ergebnisse selektierter CB PGC mCherry Chimären konnte nur ein einziger positiver Embryo nachgewiesen werden. Genomische DNA dieses Embryos wurde per PCR positiv auf das mCherry-Gen getestet. Die restlichen 296 Embryonen von dieser Chimäre (CB PGC mCherry 1B2 R011) waren negativ (siehe 5.2.3.1). Mögliche Gründe für die niedrige Keimbahn-Transmission wurden in 6.1 diskutiert. In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Resultate zur Effizienz der Keimbahn-Transmission [76, 88, 106, 112, 145]. Ursachen hierfür sind sicherlich in verschiedenen Techniken und Erfolgsquoten bei der Injektion der PGCs in Embryonen, aber auch in unterschiedlicher Effizienz der PGC Linien selbst zu finden. Bisher gibt es keine Möglichkeit *in vitro* die spätere Effizienz einer PGC Linie bei der Kolonisation der Gonaden und der Keimbahn-Transmission vorherzusagen [103].

Der mCherry-positive Embryo der Linie CB PGC mCherry 1B2 war an Tag 7 bereits abgestorben und weniger weit entwickelt als gleich lang inkubierte Embryonen. Mehrere Möglichkeiten kommen als Ursache für den Tod des Embryos in Frage: das mCherry-Protein könnte toxische Eigenschaften aufweisen, die zum Absterben des Embryos führten. Da in Mäusen nicht von einer Toxizität des mCherry-Proteins berichtet wurde [166] und auch von LSL PGC mCherry Linien abstammende mCherry-positive Embryonen und Küken keine Auffälligkeiten aufwiesen, ist dies unwahrscheinlich. Durch die Verwendung der phiC31 Integrase kommt es zur sequenzspezifischen Rekombination zwischen der attB-Rekombinationsstelle des mCherry-attB Konstrukts und pseudo-attP-Rekombinationsstellen im Hühnergenom. Leighton et al. zeigten, dass die durch phiC31 Integrase vermittelten Integrationen vorwiegend in repetitiven DNA-Elementen stattfinden, wodurch eine Beeinträchtigung von wichtigen Genen nicht erwartet wird [101]. Jedoch wurde vor Injektion der mCherry PGC Linien keine *in vitro* Überprüfung der Insertionsstelle durchgeführt. Daher besteht die Möglichkeit, dass in der Zelllinie CB PGC mCherry 1B2 die Integration des mCherry-attB Konstrukts zur Behinderung von für die embryonale Entwicklung wichtigen Genen geführt hat. Des Weiteren könnte der genetische Hintergrund der CB Hühnerlinie von

Bedeutung für den unterentwickelten und abgestorbenen Embryo sein, da auch bei nicht modifizierten CB Embryonen unterschiedlich weit entwickelte Embryonen aufgefallen waren. Zusätzlich könnte dieser Embryo auch zufällig aus Gründen, die nichts mit den durchgeführten Versuchen zu tun haben, abgestorben sein.

Aus Anpaarungen mit LSL PGC mCherry Chimären konnten zwei rot fluoreszierende Embryonen aus insgesamt 279 kontrollierten Embryonen detektiert werden. Diese Embryonen waren nicht abgestorben und zeigten keine Entwicklungsverzögerung im Vergleich zu mCherry-negativen Embryonen. Genomische DNA wurde per PCR positiv auf das mCherry-Gen getestet. Eier aus Anpaarungen der positiv getesteten LSL PGC mCherry Keimbahn-Chimären wurden bis zum Schlupf inkubiert. Heterozygote mCherry-positive Küken zweier verschiedener LSL PGC mCherry Linien schlüpften ohne Probleme und erschienen phänotypisch gesund. Keimbahn-Transmission konnte folglich von einer der beiden injizierten CB PGC mCherry Linien und bislang von zwei der drei injizierten LSL PGC mCherry Linien nachgewiesen werden. Die Tierhaltungs-Kapazitäten reichten nicht aus, um bis zur Beendigung dieser Arbeit die Keimbahn-Transmission aller LSL PGC mCherry Chimären der drei injizierten LSL PGC mCherry Linien zu testen.

Die mCherry-positiven Küken werden nun regelmäßig auf ihren Gesundheits- und Entwicklungsstatus sowie, bei Erreichen der Geschlechtsreife, auf Fruchtbarkeit und Schlupfraten untersucht werden, um toxische Effekte des mCherry-Proteins auszuschließen. Zur weiteren Analyse der Tiere sollte außerdem ein Southern Blot zur Bestimmung der Integrationsfrequenz des mCherry-attB-Plasmids durchgeführt werden, sowie Versuche zur Festlegung der Integrationsstelle. Da mCherry-positive Nachzucht von zwei unterschiedlichen LSL PGC mCherry Linien generiert werden konnte, könnte die mCherry Hühnerlinie auch dann erhalten werden, wenn die Integrationsstelle des Plasmids bei einer der beiden Linien sich wider Erwarten als problematisch herausstellen sollte. Zusätzlich sind Untersuchungen nötig, um das Expressionsmuster von mCherry in verschiedenen Zellen und Geweben zu bestimmen. Da die ubiquitäre mCherry Expression voraussichtlich auch bei heterozygoten Tieren gegeben sein wird, ist es nicht nötig auf die Etablierung homozygoter Hühner zu warten, um diese Versuche durchzuführen. Sofern sich bei den genannten Analysen keine unvorhergesehenen Abweichungen vom erwarteten Phänotyp ergeben, können die mCherry-positiven Hühner fortan für Experimente wie *in vivo imaging* und adoptive Transfers verwendet werden.

6.3 ETABLIERUNG DES CRISPR/CAS9-SYSTEMS IN HÜHNERZELLEN

Sequenzspezifische Nukleasen ermöglichen gezielte Genmodifikationen über das Einfügen von Doppelstrangbrüchen, die anschließend per NHEJ oder HDR repariert werden können [118]. TALENs wurden erfolgreich verwendet, um in PGCs Mutationen in das Ovalbumin-Gen einzufügen und die so veränderten PGCs wurden zur Erstellung einer OV Knock-out Hühnerlinie verwendet [122]. Das CRISPR/Cas9-System verspricht eine im Vergleich zu ZFN und TALEN noch einfachere und kostengünstigere Genmodifikation [75, 122]. Es bietet die Möglichkeit mit geringem Aufwand gezielt Doppelstrangbrüche in das Genom verschiedenster Organismen einzufügen und hat innerhalb kürzester Zeit die Biotechnologie revolutioniert [133, 137]. Während des Durchführens der Experimente für diese Arbeit erschienen zwei Veröffentlichungen über die Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems in PGCs und die anschließende Erstellung modifizierter Hühnerlinien. Oishi et al. benutzten das CRISPR/Cas9-System, um mittels NHEJ Mutationen im OVM-Gen einzufügen [76]. Wie bereits bei der durch Park et al. erstellten OVA Knock-out Hühnerlinie wurde kein phänotypischer Nachweis der fehlenden Gen-Funktion durchgeführt, womit nicht nachgewiesen wurde, dass die durchgeführten Modifikationen zu den erwünschten Proteinverlusten geführt haben [76, 122]. Dimitrov et al. verwendeten das CRISPR/Cas9-System, um in Kombination mit einem *repair template* gezielt eine LoxP-Stelle ins Hühnergenom einzubringen [145]. Durch die Verwendung selektierbarer Marker im *repair template* war die klonale Expansion von PGCs mit der gewünschten Modifikation möglich [145]. Dies erlaubt den Einsatz von PGCs mit genau definierten Veränderungen bei der Erstellung von Keimbahn-Chimären und genetisch modifizierten Hühnerlinien [145]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es PGCs zur Erstellung genetisch modifizierter Hühnermodelle für die immunologische Forschung einzusetzen und neben bereits etablierten Methoden auch das CRISPR/Cas9-System zu einer möglichen Steigerung der Targetingfrequenz und -effizienz am C γ Locus zu verwenden.

Möglicherweise können neben dem CRISPR/Cas9-System auch andere Endonukleasen, wie die Argonauten Proteinfamilie, zur Genmodifikation herangezogen werden [172]. Hierzu gehört die von *Natronobacterium gregoryi* stammende Argonaute Endonuklease NgAgo, die geleitet von einem 24 Nukleotide langen, einzelsträngigem, 5' phosphoryliertem DNA-Molekül Doppelstrangbrüche unabhängig vom Vorkommen eines PAM einfügen kann [172]. Gao et al. beobachteten weiterhin eine im Vergleich zum CRISPR/Cas9-System niedrigere Anfälligkeit für *off target* Effekte [172]. Allerdings bestehen mittlerweile Zweifel daran, ob die in NgAgo gesetzten Erwartungen erfüllt werden können, da die durch Gao et al. berichtete hohe Effizienz

und einfache Anwendbarkeit [172] durch andere Gruppen nicht nachvollzogen werden konnte [173].

Die ersten Publikationen zur Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems in PGCs wurden 2016 [76, 145] veröffentlicht, nachdem ein Großteil der in dieser Arbeit besprochenen Versuche bereits abgeschlossen war. Daher mussten zu Beginn des Projekts einige Versuche vorgenommen werden, um die Funktionsfähigkeit und Effizienz des CRISPR/Cas9-Systems in PGCs zu testen.

Um das CRISPR/Cas9-System in Hühnerzellen zu etablieren, wurden zunächst Versuche mit eGFP-positiven DT40 Zellen und PGCs durchgeführt. Hierfür wurde eine sgRNA-Sequenz verwendet, die effizient zu Mutationen im eGFP-Gen führt [154]. Somit war es möglich, mit einer durchflusszytometrischen Analyse den Anteil eGFP-negativer Zellen nach einigen Tagen festzustellen und eine Aussage über mögliche Targetingeffizienzen des CRISPR/Cas9-Systems in DT40 Zellen, beziehungsweise in PGCs, zu treffen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es auch nach erfolgreicher Induktion eines Doppelstrangbruches an der Zielstelle zu einer fehlerfreien Reparatur oder stillen Mutationen kommen kann. Es ist daher davon auszugehen, dass die tatsächliche Targetingeffizienz höher ist als der Anteil der eGFP-negativen Zellen. DT40 Zellen wurden für initiale Versuche verwendet, da die in Suspension wachsenden Zellen unter ähnlichen Bedingungen wie PGCs elektroporiert werden können, aber schneller wachsen, kostengünstiger kultiviert und effizienter transfiziert werden können. Bei ersten Versuchen mit PX330-sgRNA 1408 konnte festgestellt werden, dass das CRISPR/Cas9-System sowohl in DT40 Zellen als auch in PGCs in der Lage ist, sequenzspezifisch Doppelstrangbrüche einzufügen. Dabei war der Anteil an eGFP-negativen Zellen mit bis zu 45 % bei Verwendung von 15 µg PX330-sgRNA 1408 im DT40 System wesentlich höher als in PGCs (6,5 % bei Verwendung von 15 µg PX330-sgRNA 1408). Dies war jedoch aufgrund der generell schlechten Transfizienz- und Modifizierbarkeit von PGCs zu erwarten und liegt in derselben Größenordnung wie die veröffentlichten Ergebnisse beim Einsatz von TALENs und CRISPR/Cas9-System in PGCs [76, 122].

Weiterhin wurden Versuche zur Selektierbarkeit von transient mit CRISPR/Cas9-Plasmiden transfizierten Zellen durchgeführt. Durch die Verwendung von CRISPR/Cas9-Plasmiden mit Antibiotikaresistenz-Genen kann bei anschließender Selektion über einige Tage der Anteil erfolgreich transfizierter Zellen erhöht werden. Diese Möglichkeit ist vor allem dann von Bedeutung, wenn man zukünftig plant durch NHEJ modifizierte PGCs ohne klonale Selektion einzusetzen, wie beispielsweise in der von Oishi et al. durchgeführten Studie [76]. Wird ein so modifizierter Pool von PGCs zur Generierung von Keimbahn-Chimären verwendet, kann erst

durch Analyse und gezielte Anpaarung des Nachwuchses der gewünschte Genotyp erreicht werden [76]. Da die eingefügten Modifikationen nicht wie bei der Verwendung klonal selektierter PGC Linien vorab definiert sind, sind deren Auswirkungen schwieriger vorherzusagen. Vorteilhaft an dieser Methode ist, dass auf das Einfügen von Fremdgenen als Marker verzichtet werden kann. Durch das Wegfallen der für die klonale Expansion benötigten Zeitspanne verkürzt sich außerdem die benötigte Zeit von der Transfektion der Zellen bis zur Erstellung von Keimbahn-Chimären.

In eGFP-positiven DT40 Zellen konnten transfizierte Zellen nach Transfektion mit PX459-sgRNA 1408 beziehungsweise PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 durch Selektion mit Puromycin oder Hygromycin erfolgreich angereichert werden. Hierbei gab es nach Verwendung von PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 und Hygromycin deutlich weniger lebende Zellen als nach Verwendung von PX459-sgRNA 1408 und Puromycin. Eventuell war die verwendete Hygromycin-Menge zu hoch und sollte für spätere Versuche angepasst werden. Da die verwendete eGFP-positive PGC Linie ein Puromycin-Resistenz-Gen trägt, konnte PX459-sgRNA 1408 nicht getestet werden. Nach Transfektion mit PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 wurde zunächst die Selektion mit 50 µg/ml Hygromycin über zwei oder fünf Tage getestet. Obwohl diese Konzentration in der Literatur erfolgreich zur Selektion Hygromycin-resistenter PGCs eingesetzt wurde [145], konnte bei diesem Versuch keine deutliche Anreicherung der transfizierten Zellen erreicht werden. Nach erneuter Titration der zum Abtöten untransfizierter eGFP-positiver PGCs benötigten Hygromycin-Menge wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem mit PX330-p2A-Hygromycin-sgRNA 1408 transfizierte eGFP PGCs über zwei Tage mit 400 µg/ml Hygromycin selektiert wurden. Da für diesen Versuch das Amaxa® Nucleofector® II Device verwendet wurde, sind die Ergebnisse nicht unmittelbar mit denen der im ECM 830 Square Wave Electroporation System durchgeführten Elektroporationen vergleichbar. Nach Elektroporation von 10 µg Plasmid erfolgte eine Anreicherung auf 22,6 % eGFP-negative Zellen. Zur weiteren Verbesserung dieses Ergebnisses sollten Experimente mit unterschiedlichen Antibiotikum-Konzentrationen und Selektions-Zeitrahmen durchgeführt werden. Außerdem sollten CRISPR/Cas9-Konstrukte mit anderen Antibiotikaresistenz-Genen kloniert werden, um weitere Antibiotika testen zu können. Oishi et al. erzielten bei der Selektion transient transfizierter PGCs mit Puromycin und Zeocin sehr gute Ergebnisse [76]. Da bei Verwendung von Puromycin auch in anderen Studien ein rasches Absterben nicht resistenter Zellen erreicht werden konnte, ist es vermutlich ein gutes Antibiotikum zur Selektion transient transfizierter Zellen [174].

6.4 KNOCK-OUT DES TZR C γ -GENS IN PGCS

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Hühnerlinie zu generieren, die der Erforschung der Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen bei Hühnern und, modellhaft, anderen $\gamma\delta$ T-Zellreichen Spezies dienen soll.

Zur Verwirklichung dieses Ziels wurde die genetische Organisation der TZR-Gene beim Huhn zur Identifikation möglicher Zielgene betrachtet. Ein vielversprechendes Zielgen ist das C γ -Gen, welches für die C-Region der TZR γ -Kette kodiert. Im Gegensatz zu allen anderen TZR $\gamma\delta$ -Genen wurde das C γ -Gen nur einmalig im Hühnergenom beschrieben [66]. Zur Erstellung einer $\gamma\delta$ T-Zell defizienten Mäuselinie wurde das im Mäusegenom einmalig vorkommende C δ -Gen deletiert [30]. Bei C $\delta^{-/-}$ Mäusen konnten weder im Thymus noch in der Peripherie $\gamma\delta$ TZR-positive Zellen gefunden werden. Auch konnten keine Hinweise auf Zellen gefunden werden, die als Rezeptor eine TZR γ -Kette ohne TZR δ -Kette exprimieren [30]. In einem entsprechenden Ansatz wurde in dieser Arbeit das C γ -Gen im Genom von Hühner PGCs deletiert, wodurch die TZR γ -Kette nicht rearrangiert werden kann. Wenn die TZR δ -Kette wie die TZR γ -Kette bei Mäusen nicht dazu in der Lage ist, ohne TZR γ -Kette an der Zelloberfläche exprimiert zu werden, entsteht eine Hühnerlinie ohne $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor tragende Zellen.

6.4.1 Knock-out des TZR C γ -Gens mittels homologer Rekombination

Homologe Rekombination in PGCs wurde bereits erfolgreich zur Generierung von Hühnerlinien mit einem Knock-out des J_H-Gens [112] sowie des Immunglobulin leichte Ketten Lokus [117] eingesetzt. Auch wenn J_H Knock-out PGC Chimären niedrige Keimbahn-Transmissionsraten hatten [112], weisen die bei der Erstellung der Immunglobulin leichte Ketten Knock-out Hühner erreichten Keimbahn-Transmissionsraten von bis zu 45 % [117] darauf hin, dass die Ursache hierfür nicht in der Methode der homologen Rekombination zu suchen ist. Daher wurde in dieser Arbeit homologe Rekombination, teilweise nach durch das CRISPR/Cas9-System eingefügten DSB, verwendet, um das C γ -Gen zu deletieren. Dabei wurden je nach verwendeter PGC Linie unterschiedliche Transmissionsraten erreicht (siehe 5.7.1.1 und 5.7.2.1). Schließlich konnte heterozygote C γ Knock-out (KO) Nachzucht mit höherer Effizienz als bei Schusser et al. 2013 [112], jedoch mit niedrigerer Effizienz als bei Schusser et al. 2016 [117] beschrieben generiert werden. Die Gründe für die sehr unterschiedlichen Keimbahn-Transmissionsraten bei Verwendung verschiedener PGC Linien, aber auch innerhalb von Keimbahn-Chimären der selben PGC Linie sind bislang unbekannt [103].

Um zur Erstellung einer $\gamma\delta$ T-Zell defizienten Hühnerlinie das TZR C γ -Gen in PGCs zu deletieren, wurde ein Targeting Vektor für homologe Rekombination kloniert (siehe 5.3.2). Für diese Arbeit wurde der von Schusser et al. verwendete Targeting Vektor zum Knock-out des J_H-Gensegments [112] modifiziert. Die Homologie-Arme wurden durch Sequenzen ersetzt, die das Targeting des C γ -Gens ermöglichen. Die selektierbare Marker-kassette wurde unverändert beibehalten. Diese wird durch LoxP-Stellen flankiert, um später das Entfernen der selektierbaren Marker durch die Cre Rekombinase zu ermöglichen [103, 112, 171]. Dies wäre notwendig, falls die eGFP Expression der genetisch veränderten Hühnerlinie in zukünftigen Versuchen bei Untersuchungsmethoden wie Durchflusszytometrie oder Immunfluoreszenzhistologie hinderlich ist oder sich später Hinweise für eine Toxizität der selektierbaren Marker ergeben.

Da der Targeting Vektor zur homologen Rekombination in CB PGCs eingesetzt wurde, wurden die Homologie-Arme isogen von genomischer DNA dieser Hühnerlinie kloniert. Einer der wichtigsten Faktoren für eine effiziente homologe Rekombination ist die Verwendung isogener DNA-Sequenzen in den Targeting Vektoren [116]. Bei der Klonierung und Sequenzierung der entsprechenden Sequenzen wurden keine Hinweise auf Heterozygotie der CB Hühner am C γ Locus gefunden, weswegen der Targeting Vektor C γ KO 1 in verschiedenen CB PGC Linien zur homologen Rekombination verwendet werden konnte.

Die erreichte Targetingeffizienz in CB PGCs von einem korrekten Klon aus vier eGFP-positiven, Puromycin-resistenten Zellklonen (siehe 5.3.3) ist mit in der Literatur zu findenden Ergebnissen vergleichbar [101, 112]. Die hohe Targetingeffizienz bei homologer Rekombination in PGCs von mindestens 25 % könnte auf epigenetisches Silencing der selektierbaren Marker in Klonen mit inkorrektem Targeting zurückzuführen sein [101, 112].

6.4.2 Targeting des C γ -Gens mittels des CRISPR/Cas9-Systems

Um die Effizienz beim Targeting des C γ -Gens zu erhöhen und das Potential des CRISPR/Cas9-Systems für genetische Modifikationen in PGCs zu eruieren wurden mehrere sgRNA-Sequenzen für den C γ -Locus getestet.

Die sgRNA-Sequenzen wurden anhand der von ihnen induzierten Doppelstrangbruch-Stelle ausgewählt. Diese sollte möglichst nahe am 5' Beginn von Exon 1 oder am 3' Ende von Exon 3 liegen, um einen DSB nahe der Homologie-Sequenzen von C γ KO 1 zu erhalten. Für eine möglichst hohe HDR Effizienz sollte die Homologie-Sequenz nah am Doppelstrangbruch liegen [141, 175]. Des Weiteren darf die sgRNA-Sequenz nicht in der Sequenz der Homologie-

Arme enthalten sein, da Cas9 sonst auch das *repair template* schneidet [175, 176]. Weiterhin wurde bei der Auswahl der sgRNA-Sequenzen auf eine möglichst geringe Anzahl vorhergesagter *off target* Bindungsstellen geachtet sowie darauf, dass sich möglichst wenige der vorhergesagten *off target* Bindungsstellen in kodierender Sequenz befinden.

Es wurden Testtransfektionen in DT40 Zellen und anschließend ein T7 Endonuklease Assay durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit der sgRNA-Sequenzen zu überprüfen. Da die T7 Endonuklease Stellen mit fehlerhafter Basenpaarung erkennt und schneidet, kann dieser Assay genutzt werden um Mutationen durch NHEJ sichtbar zu machen [177]. Für alle von genomischer DNA von DT40 Zellen durchgeführten T7 Endonuklease Assays fielen in der Gelelektrophorese zwei zusätzliche Banden in Höhe von etwa 250 bp auf, die auch bei der Kontrolle (untransfizierte DT40 Zellen) auftraten (siehe 5.4.3.1). Diese zusätzlichen Banden sind aller Wahrscheinlichkeit nach darauf zurückzuführen, dass bei den DT40 Zellen Sequenz-Polymorphismen auftreten [178]. Von den beiden sgRNA-Sequenzen 1409 und 1410, die für die 3' Seite des *C γ* -Gens getestet wurden, zeigten die mit PX330-sgRNA 1409 transfizierten Zellen die erwarteten Banden auf Höhe von 390 bp und 110 bp nach Durchführung des T7 Endonuklease Assay. Daraus wurde geschlussfolgert, dass sgRNA 1410 nicht oder zumindest weniger effizient als sgRNA 1409 zu Doppelstrangbrüchen führt, weswegen sgRNA 1409 für die weiteren Versuche verwendet wurde.

Für die für die 5' Seite getesteten sgRNAs konnte im T7 Endonuklease Assay kein positives Ergebnis erreicht werden. Mit dem T7 Endonuklease Assay können fehlerhafte Basenpaarungen nur erkannt werden, wenn diese in mindestens 5 % der Probe auftreten [179]. Außerdem können kleine Insertionen oder Deletionen eines einzelnen Basenpaares nicht gut detektiert werden [179]. Daher wurden zusätzlich Kotransfektionen von PX330-sgRNA 1409 mit entweder PX330-sgRNA 1403, PX330-sgRNA 1411 oder PX330-sgRNA 1412 durchgeführt. Die gleichzeitige Induktion eines Doppelstrangbruches auf der 5' und 3' Seite des *C γ* -Gens lässt sich per PCR nachweisen, wenn es zu einer Deletion der zwischen den Bruchstellen liegenden Sequenz kommt [180]. Für alle drei Kombinationen gelang der Nachweis dieser Deletion per PCR. Da für die mit PX330-sgRNA 1409 und PX330-sgRNA 1403 transfizierten DT40 Zellen bei Einsatz der selben Menge genomischer DNA das stärkste Signal in der Gelelektrophorese detektiert werden konnte, wurde vermutet, dass sgRNA 1403 effizienter zu Doppelstrangbrüchen führt als sgRNA 1411 und sgRNA 1412. Daher wurde sgRNA 1403 für die weiteren Versuche ausgewählt, jedoch in dem Bewusstsein, dass es sich bei der durchgeführten PCR nicht um eine quantitative Analyse handelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass einige sgRNA-Sequenzen aus oft unbekannten Gründen nicht oder weniger

effizient sind als andere. Dabei spielt die Basenfolge an der Bindungsstelle eine Rolle sowie die Sekundärstruktur der verwendeten sgRNA-Sequenz [181]. Eine sichere *in silico* Vorhersage der Funktionsfähigkeit einer sgRNA-Sequenz ist bislang nicht möglich [182]. Daher ist es zum effizienten Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems unabdingbar die Funktionsfähigkeit der entworfenen sgRNA-Sequenzen zu bestimmen und es empfiehlt sich, mehrere sgRNA-Sequenzen für den gewünschten Lokus zu testen [141].

Neben dem T7 Endonuklease Assay und ähnlichen *missmatch cleavage* Methoden sowie der durchgeführten *Loop-out* Detektion per PCR können hierfür auch die fraglichen Sequenzen amplifiziert und sequenziert oder ein *single strand annealing assay* angewendet werden [179, 183, 184]. Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität von sequenzspezifischen Nukleasen zu testen, stellen dual-fluoreszierende Plasmide dar, in die die Zielsequenz kloniert wird. Ein Fluoreszenz-Protein dient der Kontrolle der Transfektionseffizienz; das zweite Fluoreszenz-Protein wird nur exprimiert, wenn das funktionale Gen nach einem spezifischen DSB in der Zielsequenz durch *single strand annealing* wieder hergestellt wird, wodurch die Targetingeffizienz bestimmt werden kann [185].

Das Plasmid PX333 erlaubt die gleichzeitige Expression zweier sgRNA-Sequenzen [186]. Sollen in einer Zelllinie zwei Doppelstrangbrüche mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems eingefügt werden, kann so die Menge der zu transfizierenden DNA reduziert werden. Außerdem kann sichergestellt werden, dass immer beide sgRNA-Sequenzen zusammen in die Zellen gelangen. Zum Testen dieses Plasmids wurde PX333-sgRNAs 1403 und 1410 kloniert und in DT40 Zellen transfiziert. Auch bei Verwendung dieses Konstrukts konnte die Deletion des *Cγ*-Gens per PCR nachgewiesen werden. Anhand der Bandenstärke lässt sich mutmaßen, dass der Einsatz von 20 µg PX333-sgRNAs 1403 und 1410 in etwa zum gleichen Ergebnis wie der Einsatz von je 10 µg PX330-sgRNA 1403 und PX330-sgRNA 1410 führte. Wie bereits erwähnt handelt es sich bei dieser Analyse allerdings nicht um eine quantitative Untersuchung. Zur genaueren Bestimmung der Effizienz sollte beispielsweise die entsprechende Sequenz amplifiziert, kloniert und eine ausreichende Anzahl an Klonen sequenziert werden.

Durch die Etablierung von sgRNA-Sequenzen können mittels NHEJ Mutationen in das *Cγ*-Gen eingefügt werden. Allerdings ist die Transfektions- und Targetingeffizienz in PGCs nicht hoch genug, um ohne Selektion einen ausreichenden Anteil veränderter Zellen zur Generierung von Keimbahn-Chimären zur Verfügung zu haben. Ohne die Verwendung fluoreszierender Proteine wie eGFP als Marker ist außerdem die weitere Analyse der Gonaden-Besiedlung und Keimbahn-Transmission erheblich erschwert (siehe 6.2). Um dieses Problem zu lösen könnten

Veränderungen mittels NHEJ in eGFP-positiven PGC Linien eingefügt werden. In diesem Fall kann die von der durchgeführten Modifikation unabhängige eGFP Expression zur Evaluierung der Zellen nach der Injektion in Rezipienten-Embryonen genutzt werden. Um PGCs zur Generierung einer *Cy* KO Hühnerlinie zu erstellen, wurde in dieser Arbeit ein Ansatz mit HDR bevorzugt. Die Verwendung eines *repair templates* mit selektierbaren Markern ermöglicht die Etablierung klonaler PGC Linien, die die erwünschten Veränderungen tragen [145]. Dadurch kann sicher gestellt werden, dass alle zur Transplantation in Rezipienten-Embryonen verwendeten PGCs die selbe, definierte Veränderung tragen. Es können gut wachsende PGC Linien für die Transplantation ausgewählt werden und gegebenenfalls Analysen auf *off target* Effekte bereits *in vitro* durchgeführt werden.

Um die Effizienz der homologen Rekombination am *Cy* Locus in PGCs zu steigern, wurden Kotransfektionen des Targeting Vektors *Cy* KO 1 mit einem oder zwei CRISPR/Cas9-Konstrukten (PX330-sgRNA 1403 und/oder PX330-sgRNA 1410) zum Targeting des *Cy*-Gens durchgeführt. Des Weiteren wurde *Cy* KO 2 kloniert, ein zu *Cy* KO 1 identischer Targeting Vektor mit kürzeren Homologie-Armen. In Säugerzellen konnte die Effizienz der homologen Rekombination durch das Einfügen eines Doppelstrangbruches mit Hilfe sequenzspezifischer Nukleasen bis zu 1000-fach gesteigert werden [187, 188].

Kotransfektionen von *Cy* KO 1 und einem oder beiden CRISPR/Cas9-Konstrukten führten sowohl in CB PGCs mit zu den Homologie-Armen isogener Sequenz als auch in zwei verschiedenen LSL PGC Linien zu einem erhöhten Anteil an selektierbaren Zellklonen. Alle nachfolgend selektierten und getesteten Klone zeigten eine korrekte Integration der selektierbaren Markerkassette in den *Cy* Locus, womit sich die Targetingeffizienz von 25 % auf bis zu 100 % erhöhte, wenn *Cy* KO 1 in Kombination mit einem entsprechenden CRISPR/Cas9-Konstrukt verwendet wurde. Dieses Ergebnis ist auch deshalb bemerkenswert, da diese sehr hohe Effizienz auch in den nicht isogenen LSL PGC Linien erreicht werden konnte. Für die klassische homologe Rekombination ist neben der Länge der Homologie-Arme auch eine möglichst vollständige Homologie zur Wirtssequenz von entscheidender Bedeutung [116]. Luo et al. beobachteten bei der *recombinant-adenovirus*-medierten homologen Rekombination in Schweine-Fibroblasten eine Abnahme der Targetingeffizienz von 35 % auf 0 % bei 0,3 % Unterschied in der Sequenz der 2 kb langen Homologie-Arme [189]. Harrison et al. konnten bei Verwendung nicht isogener Sequenzen eine Targetingeffizienz von lediglich 2,3 % bei homologer Rekombination in Schweine-Fibroblasten erreichen [190]. Das Einführen von Doppelstrangbrüchen am Ziellokus durch das

CRISPR/Cas9-System scheint es zu ermöglichen, den gleichen Targeting Vektor für verschiedene, nicht isogene Zelllinien zu verwenden. Da es nicht möglich ist, *in vitro* eine Vorhersage über die Keimbahn-Transmission einer PGC Linie zu treffen, ist es von großem Vorteil mehrere Zelllinien mit der gewünschten Modifikation zu erstellen und *in vivo* zu testen. Bei Einsatz von PGCs mit Auszucht-Hintergrund wäre es bei homologer Rekombination ohne induzierten Doppelstrangbruch nötig, für jede Zelllinie einen Targeting Vektor mit entsprechenden Homologie-Armen zu klonieren oder zumindest die Übereinstimmung der Sequenz zu überprüfen. Durch die Kombination mit dem CRISPR/Cas9-System kann diese Arbeit vermutlich eingespart werden. Um dieses Ergebnis abzusichern, sollte das Ausmaß der Sequenzunterschiede zwischen den CB PGCs und den beiden verwendeten LSL PGC Linien durch Sequenzierung der Loki in den LSL PGCs festgestellt werden. Außerdem sollten weitere Transfektionen in verschiedene PGC Linien und unter Verwendung verschiedener Kombinationen von Targeting Vektor und CRISPR/Cas9-Konstrukten durchgeführt werden. Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse liesen sich keine Vorteile von der Verwendung beider CRISPR/Cas9-Konstrukte im Vergleich zum Einsatz nur eines der CRISPR/Cas9-Konstrukte ableiten.

Bei der Verwendung von C γ KO 2 mit insgesamt 2 kb langen Homologie-Armen konnte in der isogenen CB PGC Linie durch Induktion von Doppelstrangbrüchen mittels CRISPR/Cas9-System ebenfalls eine hohe Targetingfrequenz und -genauigkeit erreicht werden, alle acht selektierten Klone aus $1,5 \times 10^7$ Zellen zeigten korrektes Targeting des C γ Lokus. Bei Transfektion von C γ KO 2 ohne CRISPR/Cas9-Konstrukt in 5×10^6 Zellen konnten keine Klone selektiert werden. Die Möglichkeit, Targeting Vektoren mit kürzeren Homologie-Armen zu verwenden, erleichtert die Klonierungsarbeit insbesondere für schwierige oder schlecht charakterisierte Loki [145]. Auch Dimitrov et al. konnten bei Kombination eines CRISPR/Cas9-Plasmids mit einem *repair template* mit insgesamt 2 kb Homologie-Armen eine hohe Targetingeffizienz erreichen [145]. Die Integrationsfrequenz war nach Transfektion mit je 15 μ g der Plasmide sogar so hoch, dass keine klonale Expansion der Zellklone möglich war. Nach wiederholter Elektroporation mit je 2,5 μ g jedes Plasmids konnten zwölf Klone aus 5×10^6 Zellen selektiert werden. Davon wurden neun Zellklone auf korrektes Targeting untersucht, alle waren positiv [145]. Während die erreichte Erhöhung der Targetingeffizienz dieser Arbeit mit der von Dimitrov et al. vergleichbar ist, konnte eine entsprechend hohe Frequenz an selektierbaren Klonen nicht erreicht werden. Allerdings wurden auch nicht die gleichen PGC Linien verwendet, des Weiteren kam ein unterschiedliches Zellkultursystem und unterschiedliche Plasmidmengen zum Einsatz. Weiterhin kann die Effizienz durch die Qualität

der Plasmid-DNA beeinflusst werden. Außerdem unterscheidet sich in Abhängigkeit des Target Lokus die Zugänglichkeit für genetische Modifikationen. Ebenfalls von Bedeutung ist das Ausmaß der einzufügenden Sequenzen. Mit umfangreicheren Veränderungen nimmt die Targetingeffizienz ab [191]. Dimitrov et al. verwendeten einen Targeting Vektor, der als Markerkassette ein Hygromycin-Resistenz-Gen sowie die einzufügende LoxP-Stelle enthält [145]. Die in den Targeting Vektoren dieser Arbeit verwendete Markerkassette ist deutlich umfangreicher.

Weiterhin wurde eine Kotransfektion von $C\gamma$ KO 2 und PX330-sgRNA 1410 in LSL PGCs durchgeführt. Im Anschluss an diese Transfektion konnte nur ein einziger Klon aus 5×10^6 transfizierten Zellen selektiert werden. Bei diesem Klon hatte die Markerkassette nicht an der korrekten Stelle integriert. Möglicherweise sind 2 kb Homologie-Arme bei Verwendung nicht isogener PGC Linien nicht ausreichend, um effiziente homologe Rekombination zu unterstützen. Allerdings sind weitere Testtransfektionen nötig, um diese Aussage zu unterstützen, da die schlechte Effizienz der Transfektion auch auf andere Umstände, wie beispielsweise einer mangelnden Qualität der verwendeten DNA, zurückzuführen sein kann. Durch Sequenzierung des $C\gamma$ Lokus und dessen Umgebung in den LSL PGC Linien könnte Aufschluss über das Ausmaß an Sequenzunterschieden erlangt werden. Neben der Länge und Homologie der Homologie-Arme ist die Targetingeffizienz auch von der Zelllinie, dem Target Lokus und weiteren Faktoren abhängig, sodass keine allgemeingültige Aussage getroffen werden kann [192].

6.5 GENERIERUNG GENETISCH MODIFIZIERTER HÜHNER MIT EINEM KNOCK-OUT DES $C\gamma$ -GENS

Zur Generierung einer transgenen Hühnerlinie mit Knock-out des $C\gamma$ -Gens wurden die PGC Linie CB PGC $C\gamma$ KO 3F6 sowie fünf verschiedene LSL PGC $C\gamma$ KO Linien von insgesamt zwei verschiedenen LSL PGC Elternlinien zur Erstellung von Keimbahn-Chimären verwendet. Kolonisation der Gonaden konnte für alle injizierten PGC Linien nachgewiesen werden, jedoch in sehr unterschiedlichem Ausmaß. Die relativ geringe Besiedlung von 0-15 % durch CB PGC $C\gamma$ KO 3F6 stimmt mit den generell schlechten Ergebnissen für CB PGCs in dieser Arbeit sowie anderen, nicht veröffentlichten, Versuchen überein.

Sperma der CB PGC $C\gamma$ KO Chimären wurde mittels PCR auf die integrierten Transgene untersucht. Zum Nachweis von Keimbahn-Transmission wurden sechs bis sieben Tage alte Embryonen aus Anpaarungen von Keimbahn-Chimären mit LSL-classic Hennen auf eGFP

Expression sowie gegebenenfalls per PCR auf die korrekte Integration der Markerkassette in den *Cy* Locus überprüft. Für Chimären der Linie CB PGC *Cy* KO 3F6 konnte keine Keimbahn-Transmission nachgewiesen werden. Mögliche Gründe hierfür wurden in 6.2 beleuchtet. Allerdings sollte auch berücksichtigt werden, dass die Schlupfrate der CB PGC *Cy* KO 3F6 Chimären niedrig war und nur sechs männliche Keimbahn-Chimären aufgezogen werden konnten. Eine größere Anzahl aufgezogener und getesteter Chimären hätte möglicherweise die Wahrscheinlichkeit eines positiven Resultates des Experimentes erhöht.

Die Gonaden-Besiedlung durch die LSL PGC *Cy* KO Linien war durchwegs besser und betrug je nach Linie zwischen 0-30 % und 0-80 %. Neben dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund könnte dies auch darauf zurückzuführen sein, dass die LSL PGC Linien aus embryonalem Blut isoliert worden waren, während die CB PGC Linien aus Germinal Crescent stammten. Aus der Studie von Collarini et al. 2014 lässt sich kein eindeutiger Vorteil der aus Blut stammenden PGC Linien im Vergleich zu aus Germinal Crescent stammenden PGC Linien bei der Kolonisation der Gonaden ableiten [103]. Es wurden Chimären von vier der fünf LSL PGC *Cy* KO Linien auf Keimbahn-Transmission getestet, für Chimären von drei Linien konnte Keimbahn-Transmission nachgewiesen werden. Die meisten Chimären mit Keimbahn-Transmission entstammten Injektionen der Linie LSL PGC 2-6 *Cy* KO C2, dies war auch die Linie mit der besten Gonaden-Besiedlung. Allerdings standen weder ausreichend Platz noch Wildtyp Hennen zur Verfügung, um alle Keimbahn-Chimären zu testen. Auch aus Aspekten des Tierschutzes wurde darauf verzichtet, weiter Embryonen zu testen, nachdem genug *Cy* KO^{+/-} Tiere zur Etablierung der Linie generiert worden waren. Daher lässt sich nicht endgültig beurteilen, welche PGC Linie zu der besten Keimbahn-Transmission geführt hat. Dass das Ausmaß an Keimbahn-Transmission zwischen PGC Linien, aber auch innerhalb von Chimären der gleichen Linie stark variieren kann, ist ein bekanntes Phänomen [103]. Von Keimbahn-Chimären mit nachgewiesener Transmission wurden Eier bis zum Schlupf der Küken inkubiert und die Küken auf eGFP Expression überprüft. Bei eGFP-positiven Küken wurde die korrekte Integrationsstelle der Markerkassette per PCR bestätigt. Die *Cy* KO^{+/-} Küken schlüpften problemlos und zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp Küken keine Auffälligkeiten.

Durch die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems zur Erstellung der *Cy* KO LSL PGC Linien besteht die Möglichkeit von *off target* Effekten. *In vitro* wurden keine Untersuchungen auf *off target* Effekte durchgeführt. Auch deswegen werden eine regelmäßige Kontrollen der geschlüpften *Cy* KO^{+/-} Hühner in Hinblick auf ihren Gesundheits- und Entwicklungsstatus

sowie bei Erreichen der Geschlechtsreife auf Fruchtbarkeit und Schlupfraten durchgeführt werden [145]. Des Weiteren sollte jede der unterschiedlichen C γ KO Linien auf potentielle *off target* Mutationen überprüft werden. Hierfür können potentielle *off target* Bindungsstellen der verwendeten sgRNA-Sequenz von genomischer DNA amplifiziert und sequenziert werden [76]. Um die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Auswirkungen von *off target* Effekten zu verringern, wurde bereits bei der Auswahl der sgRNA-Sequenzen auf eine möglichst niedrige Anzahl vorhergesagter *off target* Bindungsstellen, vor allem in kodierender Sequenz, geachtet. Da von drei verschiedenen LSL PGC C γ KO Linien abstammender C γ KO Nachwuchs produziert wurde, kann die C γ KO Hühnerlinie auch bei Auftreten von schwerwiegenden *off target* Effekten in einer oder zwei der LSL PGC C γ KO Linien erhalten werden.

Sobald die C γ KO^{+/-} Tiere die Geschlechtsreife erreichen, sollten sie angepaart werden um homozygote C γ KO^{-/-} Hühner zu erhalten. Erst dann kann eine vollständige Phänotypisierung der erstellten Knock-out Hühnerlinie durchgeführt werden. Besonders wichtig ist natürlich die Beantwortung der Frage, ob die C γ KO^{-/-} Tiere wie beabsichtigt $\gamma\delta$ T-Zell defizient sind. Hierfür müssen Blut sowie verschiedene Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach dem Schlupf auf das Vorhandensein von $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht werden. Bestätigt sich der erhoffte Phänotyp, so kann diese $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Hühnerlinie zukünftig für Experimente zur Aufklärung von Funktion und Bedeutung der $\gamma\delta$ T-Zellen im Huhn eingesetzt werden. Ein weiterer möglicher Phänotyp wäre die Entstehung von T-Zellen, die einen nur aus der TZR δ -Kette bestehenden TZR exprimieren, analog zum Auftreten von *heavy-chain-only* Antikörpern nach Knock-out der Immunglobulin leichte Kette-Gene in Hühnern durch Schusser et al. 2016 [117]. Sollte entgegen des aktuellen Wissensstandes ein weiteres C γ -Gen im Hühnergenom vorhanden sein, so würde die in dieser Arbeit vorgenommene Deletion des C γ -Gens vermutlich zu keiner phänotypischen Veränderung führen.

6.6 GENERIERUNG GENETISCH VERÄNDERTER HÜHNERLINIEN – AUSBLICK

Die Techniken zur Isolierung, Kultivierung, Transfektion und Transplantation von PGCs haben zu großen Fortschritten bei der Entwicklung genetisch modifizierter Hühnerlinien geführt. Durch die rasante Ausbreitung der Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems ist eine weitere Beschleunigung zu erwarten.

Bisher gibt es nur wenige Publikationen über das Einfügen gezielter Modifikationen in das Hühnergenom unter Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems [76, 145-148, 193, 194]. Weitere

Untersuchungen werden in Zukunft zu einem besseren Wissen und Verständnis der Möglichkeiten und Grenzen dieses Systems beim Einsatz am Hühnergenom führen.

Das Vornehmen genetischer Modifikationen in kultivierten PGCs mit anschließender Produktion von Hühnern mit derselben Modifikation über den Weg von Keimbahn-Chimären erlaubt das Überprüfen der entstandenen Veränderungen *in vitro*: Durch klonale Selektion von PGC Linien, die exakt die erwünschte Veränderung tragen, kann sichergestellt werden, dass auch die später von dieser PGC Linie abstammenden Tiere dieselbe Modifikation aufweisen [75, 145]. Mit sequenzspezifischen Nukleasen wie TALENs, ZFNs oder dem CRISPR/Cas9-System können auch gezielt Mutationen über NHEJ eingefügt werden [75, 76, 122]. Werden so modifizierte PGCs ohne weitere Selektion zur Generierung von Keimbahn-Chimären verwendet, so kann erst durch Analyse und gezielte Anpaarung des Nachwuchses der gewünschte Genotyp erreicht werden [76]. Da die eingefügten Modifikationen nicht wie bei der Verwendung klonal selektierter PGC Linien vorab definiert sind, sind deren Auswirkungen schwieriger vorherzusagen. Dies muss auch unter dem Aspekt des Tierschutzes berücksichtigt werden. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine Fremdgene ins Hühnergenom eingefügt werden [122], was möglicherweise eine Zulassung - beispielsweise für landwirtschaftliche Anwendungen - erleichtern könnte [195]. Es gibt aktuell zahlreiche Diskussionen darüber, ob für das Vornehmen kleiner Veränderungen am Genom, wie sie auch durch natürlich vorkommende Mutation entstehen könnten, ohne Einfügen von Fremdgenen die selben Restriktionen gelten sollten wie für andere transgene Organismen [196-198]. Das gezielte Einfügen kleinerer Mutationen nach durch das CRISPR/Cas9-System induziertem DSB ist in anderen Zelllinien auch mit Hilfe einzelsträngiger Oligonukleotide mit kurzen Homologie-Regionen möglich [199]. Eine effiziente Anwendung dieses Vorgehens in PGCs würde es erlauben definierte Modifikationen vorzunehmen, dabei aber auf das Einfügen von Fremdgenen zu verzichten. Um *off target* Mutationen zu vermeiden, könnten auch zur Arbeit am Hühnergenom zukünftig vermehrt Cas9-Nickasen zum Einsatz kommen [144, 200].

Die Kultivierung von PGCs ist arbeits- und kostenintensiv und durch den Bedarf an Personal mit den notwendigen technischen Fähigkeiten zur Etablierung von PGC Kulturen nicht ohne Weiteres zu etablieren [103]. Deswegen und auch um schneller und möglicherweise unter Einsatz geringerer Tierzahlen eine genetisch veränderte Hühnerlinie zu generieren, wird es nötig sein über andere Möglichkeiten nachzudenken. Tyack et al. verwendeten 2013 Transposons, um durch Injektion in H&H Stadium 14 Embryonen *in vivo* Modifikationen in zirkulierende PGCs einzufügen [111]. Auch wenn die in dieser Studie erreichte Keimbahn-Transmission mit bis zu 1,5 % niedrig war, besteht das Potential die verwendete Methode

zukünftig beispielsweise durch direkte Injektion von Komponenten des CRISPR/Cas9-Systems zu adaptieren, wobei die Isolierung und Kultivierung von PGCs entfällt [75]. Dies gilt auch für die durch Cooper et al. durchgeführten Versuche Hahnen-Sperma zu gewinnen, mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems zu modifizieren und anschließend direkt zur Insemination von Hennen zu verwenden, um genetisch modifizierte Nachzucht zu erlangen [194]. Durch diese Technik kann auch der Zeitrahmen bis zur Erstellung der heterozygot oder homozygot modifizierten Hühnerlinien um eine Generation verkürzt werden, da keine Keimbahn-Chimären schlüpfen und aufwachsen müssen. Allerdings entstehen bei diesem Vorgehen verschiedene durch NHEJ herbeigeführte Mutationen und keine genau definierte Veränderung des Genoms.

Es ist zu erwarten, dass zukünftig rasch weitere Neuerungen in den Techniken zur Generierung genetisch modifizierter Hühner und anderer landwirtschaftlicher Nutztiere geschaffen werden. Dabei ist es wichtig, neben Fragen der zeitlichen und finanziellen Realisierbarkeit auch benötigte Tierzahlen und Aspekte des Tierschutzes kritisch zu beurteilen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Säugern und Vögeln werden anhand ihres T-Zell-Rezeptors zwei verschiedene T-Zell-Populationen unterschieden: die $\alpha\beta$ T-Zellen und die $\gamma\delta$ T-Zellen. Die Bedeutung von $\alpha\beta$ T-Zellen in der Immunabwehr ist bereits intensiv erforscht. Dagegen scheinen $\gamma\delta$ T-Zellen von $\alpha\beta$ T-Zellen verschiedene Aufgaben zu erfüllen, die im Einzelnen noch nicht hinreichend bekannt sind. Hinzu kommt, dass Hühner sowie andere landwirtschaftliche Nutztiere im Vergleich zu Maus und Mensch einen wesentlich höheren Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut haben. Daher lassen sich Ergebnisse der Forschung an Mensch und Maus vermutlich nicht unmittelbar auf das Huhn übertragen.

Für die Erforschung komplexer immunologischer Fragestellungen ist die Verfügbarkeit passender, oft genetisch modifizierter Tiermodelle von großer Bedeutung. Mäuse werden häufig als Modellorganismen eingesetzt, um zu ermitteln welche Rolle bestimmte Zellen bei der Immunabwehr oder bei Krankheiten einnehmen. Durch jahrzehntelange Forschung unter Verwendung von Mäuse-Stammzell-Technologien ist die reverse Genetik im Mäusemodell sehr gut etabliert. Bis vor kurzem waren diese Methoden nicht in Hühnern anwendbar.

Erst die technischen Fortschritte in den letzten Jahren, wie die Kultivierung und Transfektion primordialer Keimzellen (PGCs), machten es möglich, die reverse Genetik auch für die Erforschung von Genfunktionen beim Huhn zu nutzen. Ziel dieser Arbeit war es, die Methoden zur genetischen Modifikation in PGCs zu verwenden und zu verbessern, indem diese Zellen isoliert, kultiviert und transfiziert wurden. Anschließend wurden die PGCs zurück in Embryonen transplantiert, um eine ubiquitär mCherry exprimierende Hühnerlinie sowie eine $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Hühnerlinie zu generieren. Des Weiteren sollte das Potential des CRISPR/Cas9-Systems zum Einsatz in primordialen Keimzellen getestet werden und zur Etablierung einer $\gamma\delta$ T-Zell defizienten Hühnerlinie eingesetzt werden. Die Versuche wurden in CB PGCs mit Inzuchthintergrund sowie LSL PGCs mit Auszuchthintergrund durchgeführt.

Es wurden erfolgreich PGC Linien unterschiedlichen genetischen Hintergrunds isoliert, kultiviert und anschließend zur spezifischen Modifikation des $C\gamma$ -Gens verwendet. Hierfür wurde klassische homologe Rekombination oder eine Kombination mit dem CRISPR/Cas9-System eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass das CRISPR/Cas9-System in der Lage ist, spezifische Doppelstrangbrüche in das Genom von Hühnerzellen wie DT40 Zellen und PGCs einzufügen. Durch Kombination des CRISPR/Cas9-Systems mit Targeting Vektoren zur homologen Rekombination konnten definierte genomische Veränderungen mit hoher Effizienz

vorgenommen werden. Diese Methode erlaubt das Vornehmen spezifischer Veränderungen am Hühnergenom sowie das Einfügen von Fremdgenen am gewünschten Lokus. PGCs mit auf diese Weise vorgenommenen Modifikationen wurden zur Generierung transgener Hühner verwendet. Dieses Vorgehen hat das Potential, zukünftig die Erstellung genetisch modifizierter Hühnermodelle zu vereinfachen.

Um eine $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Hühnerlinie zu generieren, wurde das nur einmalig im Hühnergenom beschriebene C γ -Gen deletiert. Hierfür wurde ein Targeting Vektor zur homologen Rekombination kloniert. Durch Kombination mit für das C γ -Gen spezifischen CRISPR/Cas9-Konstrukten konnte eine Steigerung der Targetingeffizienz in isogenen und nicht-isogenen PGC Linien erreicht werden. Klonal expandierte C γ KO PGC Linien wurden zur Generierung von Keimbahn-Chimären verwendet. Von CB PGC C γ KO Keimbahn-Chimären konnte keine Keimbahn-Transmission nachgewiesen werden. Mehrere LSL PGC C γ KO Chimären zeigten Keimbahn-Transmission und erzeugten heterozygote C γ -KO^{+/-} Küken. Weitere Analysen nach Etablierung homozygoter C γ KO^{-/-} Tiere sind nötig, um den gewünschten Phänotyp zu bestätigen.

Zudem wurde eine Hühnerlinie mit ubiquitärer mCherry-Expression generiert, indem ein mCherry-attB-Konstrukt kloniert und gemeinsam mit einem phiC31 Integrase Plasmid in PGCs transfiziert wurde. mCherry-positive PGC Linien wurden zur Generierung von Keimbahn-Chimären verwendet. CB PGC mCherry Chimären zeigten eine sehr geringe Keimbahn-Transmission und es war mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht möglich, mCherry CB Nachzucht zu erzeugen. Von LSL PGC mCherry Chimären konnte Keimbahn-Transmission nachgewiesen werden. Nachfolgend schlüpften heterozygote mCherry^{+/-} Küken. Diese Linie kann nun für adoptive Transferexperimente und *in vivo imaging* Verfahren eingesetzt werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das CRISPR/Cas9-System zur Modifikation des Hühnergenoms in PGCs geeignet ist. Die Targetingeffizienz von Vektoren zur homologen Rekombination konnte durch Kombination mit spezifischen CRISPR/Cas9-Konstrukten gesteigert werden. Es ist gelungen, heterozygote mCherry^{+/-} sowie heterozygote C γ KO^{+/-} Hühner zu erzeugen, die nun für die Erforschung immunologischer Fragestellungen am Huhn eingesetzt werden können.

8. SUMMARY

In mammals and birds, two distinct T-cell lines can be discriminated according to their T cell-receptor usage: the $\alpha\beta$ T cells and the $\gamma\delta$ T-cells. There has been intense research into the role of $\alpha\beta$ T-cells in the immune defense. However, $\gamma\delta$ T-cells seem to have distinct functions which are presently not fully understood. Furthermore, in chickens and other livestock $\gamma\delta$ T-cells are much more frequent in the peripheral blood compared to human and mouse. Therefore, research in humans and mice may not be directly transferable to chicken.

To carry out research into complex immunologic topics, it is important to have access to suitable, often genetically modified animal models. Mice are frequently used as model organism to better understand the role of cells and cellular factors in immunity and disease. Reverse genetics are well established in mouse models, due to decades of research using mouse stem cell technologies. Until recently, these methods were not available in chickens.

Technological improvements during the last couple of years such as culture and transfection of primordial germ cells (PGCs) have made it possible to use reverse genetic for investigation on gene functions in chickens. The aim of this study was to use and advance the methods of genetic alteration in PGCs by isolating, culturing and transfecting followed by transplanting these cells back into embryos, in order to generate a chicken line with ubiquitous mCherry expression and a chicken line lacking $\gamma\delta$ T-cells. Furthermore, the potential of the CRISPR/Cas9-system to edit genes in PGCs was investigated and used to establish a $\gamma\delta$ T-cell deficient chicken line. Experiments were carried out in inbred CB PGCs and LSL PGCs with an outbred genetic background.

PGC lines from different genetic backgrounds were successfully isolated, cultured and used to specifically modify the $C\gamma$ -gene by traditional homologous recombination or by homologous recombination in combination with the CRISPR/Cas9-system. It was shown that the CRISPR/Cas9-system is able to introduce specific double-stranded breaks in the genome of chicken cells like DT40 and PGCs. By combining CRISPR/Cas9-system with targeting vectors for homologous recombination, defined genomic modifications were introduced with high efficiency. This method allows to make specific changes to the chicken genome or to knock-in genes into the desired locus. This method has the potential to facilitate the generation of genetically modified chicken models in the future.

To establish a $\gamma\delta$ T-cell deficient chicken line, the single known $C\gamma$ -gene was targeted in the chicken genome. A targeting vector for homologous recombination was cloned. By

combination with C γ -gene specific CRISPR/Cas9-constructs, targeting efficiency was increased in isogenic and non-isogenic PGC lines. Clonally expanded C γ KO PGC lines were then used to generate germline chimeras. However, no germline transmission was detected from CB PGC C γ KO germline chimeras. On the other hand, several LSL PGC C γ KO chimeras showed germline transmission and produced heterozygous C γ KO^{+/-} offspring. After breeding of homozygous C γ KO^{-/-} chickens, further analyses can be carried out to prove the desired phenotype.

A chicken line with ubiquitous mCherry expression was generated by the construction of a mCherry-attB-construct that was cotransfected with a phiC31 plasmid in PGCs. mCherry-positive PGC lines were then used for the generation of germline chimeras. CB PGC mCherry chimeras had very low germline transmission efficiency and with the methods used in this study, no mCherry CB offspring was obtained. Germline transmission was shown for LSL PGC mCherry chimeras, heterozygous mCherry^{+/-} offspring hatched subsequently and will be become a useful tool for adoptive transfer studies and *in vivo* imaging.

This study has shown that the CRISPR/Cas9-system can be used to modify the chicken genome in PGCs. Targeting efficiency for homologous recombination was increased by combining with specific CRISPR/Cas9-constructs. Heterozygous mCherry^{+/-} chickens and heterozygous C γ KO^{+/-} chickens were successfully generated and will be used to address immunological questions in the chicken.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Roberts, S.J., et al., *T-cell alpha beta + and gamma delta + deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11774-9.
2. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity*. Nature, 1983. **302**(5909): p. 575-81.
3. Carding, S.R. and P.J. Egan, *Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 336-45.
4. Mackay, C.R. and W.R. Hein, *A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype*. Int Immunol, 1989. **1**(5): p. 540-5.
5. Walcheck, B. and M.A. Jutila, *Bovine gamma delta T cells express high levels of functional peripheral lymph node homing receptor (L-selectin)*. Int Immunol, 1994. **6**(1): p. 81-91.
6. Yang, H. and R.M. Parkhouse, *Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues*. Immunology, 1996. **89**(1): p. 76-83.
7. Sowder, J.T., et al., *A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor*. J Exp Med, 1988. **167**(2): p. 315-22.
8. Chen, C.H., et al., *T cell development in the chicken*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 1012-8.
9. Coltey, M., et al., *Analysis of the first two waves of thymus homing stem cells and their T cell progeny in chick-quail chimeras*. J Exp Med, 1989. **170**(2): p. 543-57.
10. Char, D., et al., *A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3547-55.
11. Dunon, D., et al., *Ontogeny of the immune system: gamma/delta and alpha/beta T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 977-88.
12. Murphy, K.M., *The development and survival of lymphocytes: The development of T lymphocytes in the thymus*, in *Janeway's Immunobiology*. 2011, Garland Science. p. 290-305.
13. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.

14. Davidson, N.J. and R.L. Boyd, *Delineation of chicken thymocytes by CD3-TCR complex, CD4 and CD8 antigen expression reveals phylogenically conserved and novel thymocyte subsets*. Int Immunol, 1992. **4**(10): p. 1175-82.
15. Hayday, A.C., et al., *Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes*. Cell, 1985. **40**(2): p. 259-69.
16. Janeway, C.A., Jr., B. Jones, and A. Hayday, *Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors*. Immunol Today, 1988. **9**(3): p. 73-6.
17. Brenner, M.B., et al., *Identification of a putative second T-cell receptor*. Nature, 1986. **322**(6075): p. 145-9.
18. Hata, S., M.B. Brenner, and M.S. Krangel, *Identification of putative human T cell receptor delta complementary DNA clones*. Science, 1987. **238**(4827): p. 678-82.
19. Loh, E.Y., et al., *Identification and sequence of a fourth human T cell antigen receptor chain*. Nature, 1987. **330**(6148): p. 569-72.
20. Chien, Y.H., et al., *A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation*. Nature, 1987. **327**(6124): p. 677-82.
21. Piccinni, B., et al., *Sheep (Ovis aries) T cell receptor alpha (TRA) and delta (TRD) genes and genomic organization of the TRA/TRD locus*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 709.
22. Vantourout, P. and A. Hayday, *Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 88-100.
23. Hodges, E., et al., *Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes*. J Clin Pathol, 2003. **56**(1): p. 1-11.
24. Raulet, D.H., *The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 175-207.
25. Pereira, P., et al., *Rearrangement and expression of Vzeta1, Vzeta2 and Vzeta3 TCR zeta genes in C57BL/6 mice*. Int Immunol, 1996. **8**(1): p. 83-90.
26. Herzig, C.T., M.P. Lefranc, and C.L. Baldwin, *Annotation and classification of the bovine T cell receptor delta genes*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 100.
27. Bosc, N. and M.P. Lefranc, *The mouse (Mus musculus) T cell receptor alpha (TRA) and delta (TRD) variable genes*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(6-7): p. 465-97.
28. Asarnow, D.M., et al., *Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells*. Cell, 1988. **55**(5): p. 837-47.

29. Itohara, S., et al., *Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 754-7.
30. Itohara, S., et al., *T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes*. Cell, 1993. **72**(3): p. 337-48.
31. Boehm, T., et al., *VLR-based adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 203-20.
32. Das, H., M. Sugita, and M.B. Brenner, *Mechanisms of Vdelta1 gammadelta T cell activation by microbial components*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6578-86.
33. Kalyan, S. and D. Kabelitz, *Defining the nature of human gammadelta T cells: a biographical sketch of the highly empathetic*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(1): p. 21-9.
34. Strid, J., et al., *Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis*. Nat Immunol, 2008. **9**(2): p. 146-54.
35. Wang, L., et al., *Antibacterial effect of human V gamma 2V delta 2 T cells in vivo*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1349-57.
36. Sciammas, R., et al., *Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell*. J Immunol, 1994. **152**(11): p. 5392-7.
37. Crowley, M.P., et al., *The recognition of the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule, T10, by the gammadelta T cell, G8*. J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1223-30.
38. Shin, S., et al., *Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors*. Science, 2005. **308**(5719): p. 252-5.
39. Hayday, A. and R. Tigelaar, *Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 233-42.
40. Groh, V., et al., *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells*. Science, 1998. **279**(5357): p. 1737-40.
41. Harly, C., et al., *Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset*. Blood, 2012. **120**(11): p. 2269-79.
42. Morita, C.T., et al., *Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 59-76.
43. Wang, H. and C.T. Morita, *Sensor function for butyrophilin 3A1 in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T Cells*. J Immunol, 2015. **195**(10): p. 4583-94.

44. Clark, E.L. and D.P. Blake, *Genetic mapping and coccidial parasites: past achievements and future prospects*. J Biosci, 2012. **37**(5): p. 879-86.
45. Lillehoj, H.S. and J.M. Trout, *Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development*. Avian Pathol, 1993. **22**(1): p. 3-31.
46. Lahn, M., et al., *gammadelta T cells as regulators of airway hyperresponsiveness*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **125**(3): p. 203-10.
47. Selin, L.K., et al., *Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6784-94.
48. Wang, T., et al., *Gamma delta T cells facilitate adaptive immunity against West Nile virus infection in mice*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1825-32.
49. Sutton, C.E., L.A. Mielke, and K.H. Mills, *IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells*. Eur J Immunol, 2012. **42**(9): p. 2221-31.
50. Xu, S. and X. Cao, *Interleukin-17 and its expanding biological functions*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(3): p. 164-74.
51. Wen, L., et al., *Immunoglobulin synthesis and generalized autoimmunity in mice congenitally deficient in alpha beta(+) T cells*. Nature, 1994. **369**(6482): p. 654-8.
52. Gogoi, D. and S.V. Chiplunkar, *Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside*. Indian J Med Res, 2013. **138**(5): p. 755-61.
53. Strid, J., et al., *The intraepithelial T cell response to NKG2D-ligands links lymphoid stress surveillance to atopy*. Science, 2011. **334**(6060): p. 1293-7.
54. Wen, L., et al., *Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by "non alpha/beta" T cells*. J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2271-82.
55. Mills, R.E., et al., *Defects in skin gamma delta T cell function contribute to delayed wound repair in rapamycin-treated mice*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3974-83.
56. Boismenu, R. and W.L. Havran, *Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells*. Science, 1994. **266**(5188): p. 1253-5.
57. Hayday, A.C., *Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 184-96.
58. Brandes, M., K. Willimann, and B. Moser, *Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells*. Science, 2005. **309**(5732): p. 264-8.

59. Brandes, M., et al., *Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2307-12.
60. Himoudi, N., et al., *Human gammadelta T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells*. J Immunol, 2012. **188**(4): p. 1708-16.
61. Rast, J.P., et al., *alpha, beta, gamma, and delta T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny*. Immunity, 1997. **6**(1): p. 1-11.
62. Kubota, T., et al., *Characterization of an avian (Gallus gallus domesticus) TCR alpha delta gene locus*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3858-66.
63. Parra, Z.E. and R.D. Miller, *Comparative analysis of the chicken TCRalpha/delta locus*. Immunogenetics, 2012. **64**(8): p. 641-5.
64. Parra, Z.E., et al., *A second TCRdelta locus in Galliformes uses antibody-like V domains: insight into the evolution of TCRdelta and TCRmu genes in tetrapods*. J Immunol, 2012. **188**(8): p. 3912-9.
65. Six, A., et al., *Characterization of avian T-cell receptor gamma genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15329-34.
66. Smith, A.L. and T.W. Göbel, *Avian T cells: antigen recognition and lineages*, in *Avian Immunology*, K.A. Schat, Kaspers, B. and Kaiser, P., Editor. 2013: Academic Press. p. 91-102.
67. Kasahara, Y., C.H. Chen, and M.D. Cooper, *Growth requirements for avian gamma delta T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and in vivo priming*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2230-6.
68. Cooper, M.D., et al., *Avian T cell ontogeny*. Adv Immunol, 1991. **50**: p. 87-117.
69. Cihak, J., et al., *In vivo depletion of chicken T-cell subsets*. Scand J Immunol, 1993. **38**(2): p. 123-9.
70. Quere, P., M.D. Cooper, and G.J. Thorbecke, *Characterization of suppressor T cells for antibody production by chicken spleen cells. I. Antigen-induced suppressor cells are CT8+, TcR1+ (gamma delta) T cells*. Immunology, 1990. **71**(4): p. 517-22.
71. Polasky, C., et al., *Non-specific activation of CD8alpha-characterised gamma/delta T cells in PBL cultures of different chicken lines*. Vet Immunol Immunopathol, 2016. **179**: p. 1-7.
72. Pieper, J., U. Methner, and A. Berndt, *Characterization of avian gammadelta T-cell subsets after Salmonella enterica serovar Typhimurium infection of chicks*. Infect Immun, 2011. **79**(2): p. 822-9.

73. Pieper, J., U. Methner, and A. Berndt, *Heterogeneity of avian gammadelta T cells*. Vet Immunol Immunopathol, 2008. **124**(3-4): p. 241-52.
74. Janssen, O., R. Sanzenbacher, and D. Kabelitz, *Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations*. Cell Tissue Res, 2000. **301**(1): p. 85-99.
75. Doran, T.J., et al., *Advances in genetic engineering of the avian genome: "Realising the promise"*. Transgenic Res, 2016. **25**(3): p. 307-19.
76. Oishi, I., et al., *Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23980.
77. Houdebine, L.M., *The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression*. J Biotechnol, 2002. **98**(2-3): p. 145-60.
78. Love, J., et al., *Transgenic birds by DNA microinjection*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(1): p. 60-3.
79. Miles, E.L., et al., *Transgenic pig carrying green fluorescent proteasomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(16): p. 6334-9.
80. Kochav, S., M. Ginsburg, and H. Eyal-Giladi, *From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. II. Microscopic anatomy and cell population dynamics*. Dev Biol, 1980. **79**(2): p. 296-308.
81. Nopora, K., *Entwicklung lentiviraler Vektoren für die B-zellspezifische Expression von Transgenen in vivo*, in *Fakultät für Biologie*. 2009, Ludwigs-Maximilians-Universität München.
82. Salter, D.W. and L.B. Crittenden, *Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germ line of the chicken*. Theor Appl Genet, 1989. **77**(4): p. 457-61.
83. Bosselman, R.A., et al., *Germline transmission of exogenous genes in the chicken*. Science, 1989. **243**(4890): p. 533-5.
84. McGrew, M.J., et al., *Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors*. EMBO Rep, 2004. **5**(7): p. 728-33.
85. Mozdziak, P.E., et al., *Development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase*. Dev Dyn, 2003. **226**(3): p. 439-45.
86. Eyal-Giladi, H. and S. Kochav, *From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology*. Dev Biol, 1976. **49**(2): p. 321-37.

87. Lillico, S.G., et al., *Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(6): p. 1771-6.
88. van de Lavoie, M.C., et al., *Germline transmission of genetically modified primordial germ cells*. Nature, 2006. **441**(7094): p. 766-9.
89. Whyte, J., et al., *FGF, Insulin, and SMAD signaling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal*. Stem Cell Reports, 2015. **5**(6): p. 1171-82.
90. Kuwana, T., *Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage*. Development, Growth and Differentiation, 1993. **35**: p. 403-406.
91. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. Journal of Morphology, 1951. **8**: p. 49-92.
92. De Melo Bernardo, A., et al., *Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation*. Biol Open, 2012. **1**(11): p. 1146-52.
93. Nieuwkoop, P.D. and L.A. Sutasurya, *Primordial germ cells in the chordates: embryogenesis and phylogenesis*. Cambridge University Press, 1979.
94. Lee, H.J., H.C. Lee, and J.Y. Han, *Germline modification and engineering in avian species*. Mol Cells, 2015. **38**(9): p. 743-9.
95. Tajima, A., et al., *Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (Gallus domesticus)*. Theriogenology, 1993. **40**(3): p. 509-19.
96. Vick, L., Y. Li, and K. Simkiss, *Transgenic birds from transformed primordial germ cells*. Proc Biol Sci, 1993. **251**(1332): p. 179-82.
97. Yasuda, Y., et al., *A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells*. J Reprod Fertil, 1992. **96**(2): p. 521-8.
98. Naito, M., et al., *Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring*. J Reprod Fertil, 1994. **102**(2): p. 321-5.
99. Han, J.Y., et al., *Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained in vitro for an extended period*. Theriogenology, 2002. **58**(8): p. 1531-9.
100. Song, Y., et al., *Characteristics of long-term cultures of avian primordial germ cells and gonocytes*. Biol Reprod, 2014. **90**(1): p. 15.
101. Leighton, P.A., et al., *Genetic modification of primordial germ cells by gene trapping, gene targeting, and phiC31 integrase*. Mol Reprod Dev, 2008. **75**(7): p. 1163-75.
102. Sang, H., *Transgenesis sunny-side up*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(8): p. 955-6.

103. Collarini, E., et al., *Inserting random and site-specific changes into the genome of chickens*. Poult Sci, 2014.
104. Liesner, R., *Mutational analysis of PhiC31 integrase to improve gene therapeutic applications*, in *Fakultät für Biologie*. 2010, LMU München.
105. Munoz-Lopez, M. and J.L. Garcia-Perez, *DNA transposons: nature and applications in genomics*. Curr Genomics, 2010. **11**(2): p. 115-28.
106. Macdonald, J., et al., *Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(23): p. E1466-72.
107. Cary, L.C., et al., *Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of Trichoplusia ni transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses*. Virology, 1989. **172**(1): p. 156-69.
108. Kawakami, K., et al., *Excision of the tol2 transposable element of the medaka fish, Oryzias latipes, in zebrafish, Danio rerio*. Gene, 1998. **225**(1-2): p. 17-22.
109. Ivics, Z., et al., *Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates*. Nat Methods, 2009. **6**(6): p. 415-22.
110. Park, T.S. and J.Y. Han, *piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. 9337-41.
111. Tyack, S.G., et al., *A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells*. Transgenic Res, 2013. **22**(6): p. 1257-64.
112. Schusser, B., et al., *Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(50): p. 20170-5.
113. Watson, J.D., et al., *Die homologe Rekombination auf molekularer Ebene*, in *Watson Molekularbiologie*. 2010, Pearson. p. 323-358.
114. Capecchi, M.R., *Altering the genome by homologous recombination*. Science, 1989. **244**(4910): p. 1288-92.
115. Janning, W. and E. Knust, *Homologe Rekombination*, in *Genetik*. 2008, Thieme. p. 295.
116. te Riele, H., E.R. Maandag, and A. Berns, *Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 5128-32.
117. Schusser, B., et al., *Expression of heavy chain-only antibodies can support B-cell development in light chain knockout chickens*. Eur J Immunol, 2016.

118. Kim, H. and J.S. Kim, *A guide to genome engineering with programmable nucleases*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(5): p. 321-34.
119. Gaj, T., C.A. Gersbach, and C.F. Barbas, 3rd, *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. Trends Biotechnol, 2013. **31**(7): p. 397-405.
120. Miller, J.C., et al., *A TALE nuclease architecture for efficient genome editing*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(2): p. 143-8.
121. Bibikova, M., et al., *Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases*. Genetics, 2002. **161**(3): p. 1169-75.
122. Park, T.S., et al., *Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(35): p. 12716-21.
123. Himly, M., et al., *The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses*. Virology, 1998. **248**(2): p. 295-304.
124. Ishino, Y., et al., *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*. J Bacteriol, 1987. **169**(12): p. 5429-33.
125. Mojica, F.J., et al., *Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria*. Mol Microbiol, 2000. **36**(1): p. 244-6.
126. Jansen, R., et al., *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes*. Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1565-75.
127. Mojica, F.J., et al., *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. J Mol Evol, 2005. **60**(2): p. 174-82.
128. Makarova, K.S., et al., *A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action*. Biol Direct, 2006. **1**: p. 7.
129. Barrangou, R., et al., *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes*. Science, 2007. **315**(5819): p. 1709-12.
130. Heler, R., et al., *Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation*. Nature, 2015. **519**(7542): p. 199-202.
131. Garneau, J.E., et al., *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA*. Nature, 2010. **468**(7320): p. 67-71.
132. Brouns, S.J., et al., *Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes*. Science, 2008. **321**(5891): p. 960-4.

133. Doudna, J.A. and E. Charpentier, *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. Science, 2014. **346**(6213): p. 1258096.
134. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
135. Sapranaukas, R., et al., *The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(21): p. 9275-82.
136. Deltcheva, E., et al., *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 602-7.
137. Hsu, P.D., E.S. Lander, and F. Zhang, *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*. Cell, 2014. **157**(6): p. 1262-78.
138. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013. **339**(6121): p. 819-23.
139. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 2013. **339**(6121): p. 823-6.
140. Jinek, M., et al., *RNA-programmed genome editing in human cells*. Elife, 2013. **2**: p. e00471.
141. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nature Protocols, 2013. **8**(11).
142. Sander, J.D. and J.K. Joung, *CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(4): p. 347-55.
143. Wu, X., et al., *Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(7): p. 670-6.
144. Ran, F.A., et al., *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity*. Cell, 2013. **154**(6): p. 1380-9.
145. Dimitrov, L., et al., *Germline gene editing in chickens by efficient CRISPR-mediated homologous recombination in primordial germ cells*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0154303.
146. Bai, Y., et al., *Efficient genome editing in chicken DF-1 cells using the CRISPR/Cas9 system*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(4): p. 917-23.
147. Zuo, Q., et al., *Site-directed genome knockout in chicken cell line and embryos can use CRISPR/Cas gene editing technology*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(6): p. 1787-92.

148. Veron, N., et al., *CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken*. Dev Biol, 2015. **407**(1): p. 68-74.
149. Lin, S., et al., *Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery*. Elife, 2014. **3**: p. e04766.
150. Plachy, J., et al., *Prague inbred lines of chickens: a biological model for MHC research*. Folia Biol (Praha), 1989. **35**(4): p. 177-96.
151. Baba, T.W., B.P. Giroir, and E.H. Humphries, *Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes*. Virology, 1985. **144**(1): p. 139-51.
152. Wang, H., M. Qi, and A.J. Cutler, *A simple method of preparing plant samples for PCR*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(17): p. 4153-4.
153. Bailes, S.M., et al., *An inexpensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion*. Poult Sci, 2007. **86**(1): p. 102-6.
154. Jao, L.E., S.R. Wentz, and W. Chen, *Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(34): p. 13904-9.
155. Mozdziak, P.E. and J.N. Petitte, *Status of transgenic chicken models for developmental biology*. Dev Dyn, 2004. **229**(3): p. 414-21.
156. van de Lavoie, M.C., et al., *High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells*. Mech Dev, 2006. **123**(1): p. 31-41.
157. Pain, B., et al., *Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities*. Development, 1996. **122**(8): p. 2339-48.
158. Petitte, J.N., et al., *Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells*. Development, 1990. **108**(1): p. 185-9.
159. Nyabi, O., et al., *Efficient mouse transgenesis using Gateway-compatible ROSA26 locus targeting vectors and F1 hybrid ES cells*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(7): p. e55.
160. Irion, S., et al., *Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(12): p. 1477-82.
161. Kobayashi, T., et al., *Identification of rat Rosa26 locus enables generation of knock-in rat lines ubiquitously expressing tdTomato*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(16): p. 2981-6.
162. Yang, D., et al., *Identification and characterization of rabbit ROSA26 for gene knock-in and stable reporter gene expression*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25161.

163. Li, X., et al., *Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing*. Cell Res, 2014. **24**(4): p. 501-4.
164. Perry, M.M. and H.M. Sang, *Transgenesis in chickens*. Transgenic Res, 1993. **2**(3): p. 125-33.
165. Ivarie, R., *Avian transgenesis: progress towards the promise*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(1): p. 14-9.
166. Fink, D., et al., *Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mCherry in transgenic mice*. Genesis, 2010. **48**(12): p. 723-9.
167. Deliolanis, N., et al., *In-vivo lung cancer imaging in mice using 360 degrees free-space fluorescence molecular tomography*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2006. **1**: p. 2370-2.
168. Winnard, P.T., Jr., J.B. Kluth, and V. Raman, *Noninvasive optical tracking of red fluorescent protein-expressing cancer cells in a model of metastatic breast cancer*. Neoplasia, 2006. **8**(10): p. 796-806.
169. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 1567-72.
170. Weissmann, A., et al., *Sexing domestic chicken before hatch: a new method for in ovo gender identification*. Theriogenology, 2013. **80**(3): p. 199-205.
171. Leighton, P.A., et al., *Generation of chickens expressing Cre recombinase*. Transgenic Res, 2016. **25**(5): p. 609-616.
172. Gao, F., et al., *DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(7): p. 768-73.
173. Blow, N.P.D., *To Edit or Not: The Ngago Story*. Biotechniques, 2016. **61**(4): p. 172-174.
174. Sato, M., et al., *Determination of the optimal concentration of several selective drugs useful for generating multi-transgenic porcine embryonic fibroblasts*. Reprod Domest Anim, 2012. **47**(5): p. 759-65.
175. Cong, L. Zhang *Lab's CRISPR Frequently Asked Questions*. [cited 2016 19.09.]; Available from: <https://www.addgene.org/crispr/zhang/faq/>.
176. Singh, P., J.C. Schimenti, and E. Bolcun-Filas, *A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications*. Genetics, 2015. **199**(1): p. 1-15.
177. Babon, J.J., M. McKenzie, and R.G. Cotton, *The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7 endonuclease I in mutation detection*. Mol Biotechnol, 2003. **23**(1): p. 73-81.

178. Brinkman, E.K., et al., *Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(22): p. e168.
179. Vouillot, L., A. Thelie, and N. Pollet, *Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases*. G3 (Bethesda), 2015. **5**(3): p. 407-15.
180. Bauer, D.E., M.C. Canver, and S.H. Orkin, *Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9*. J Vis Exp, 2015(95): p. e52118.
181. Liu, X., et al., *Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19675.
182. Zhang, J.H., et al., *Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering*. Bioengineered, 2016. **7**(3): p. 166-74.
183. Mashiko, D., et al., *Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 3355.
184. Brinkman, E.K., et al., *Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition*. Nucleic Acids Res, 2014.
185. Zhou, Y., et al., *Enhanced genome editing in mammalian cells with a modified dual-fluorescent surrogate system*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(13): p. 2543-63.
186. Maddalo, D., et al., *In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system*. Nature, 2014. **516**(7531): p. 423-7.
187. Park, K.E., et al., *Targeted gene knockin in porcine somatic cells using CRISPR/Cas ribonucleoproteins*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(6).
188. Rouet, P., F. Smih, and M. Jasin, *Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 6064-8.
189. Luo, Y., L. Bolund, and C.B. Sorensen, *Pig gene knockout by rAAV-mediated homologous recombination: comparison of BRCA1 gene knockout efficiency in Yucatan and Gottingen fibroblasts with slightly different target sequences*. Transgenic Res, 2012. **21**(3): p. 671-6.
190. Harrison, S.J., et al., *Efficient generation of alpha(1,3) galactosyltransferase knockout porcine fetal fibroblasts for nuclear transfer*. Transgenic Res, 2002. **11**(2): p. 143-50.
191. Li, K., et al., *Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105779.
192. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2281-308.

193. Abu-Bonsrah, K.D., D. Zhang, and D.F. Newgreen, *CRISPR/Cas9 targets chicken embryonic somatic cells in vitro and in vivo and generates phenotypic abnormalities*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34524.
194. Cooper, C.A., et al., *Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE)*. Transgenic Res, 2016.
195. Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina, D.F., acatech - Deutsche Akademie der Technikwissenschaften, Union der deutschen Akademien der Wissenschaften. *Chancen und Grenzen des genome editing/The opportunities and limits of genome editing*. 2015; Available from: http://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/2015/stellungnahme_genome_editing_2015.pdf.
196. Ledford, H., *Gene-editing surges as US rethinks regulations*. Nature, 2016. **532**(7598): p. 158-9.
197. Kuzma, J., *Policy: Reboot the debate on genetic engineering*. Nature, 2016. **531**(7593): p. 165-7.
198. Servick, K., *SCIENCE POLICY. U.S. to review agricultural biotech regulations*. Science, 2015. **349**(6244): p. 131.
199. Paquet, D., et al., *Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9*. Nature, 2016. **533**(7601): p. 125-9.
200. Lee, J.H., S.W. Kim, and T.S. Park, *Myostatin gene knockout mediated by Cas9-D10A nickase in chicken DF1 cells without off-target effect*. Asian-Australas J Anim Sci, 2016.

10. ANHANG

A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4 (Material und Methoden) integriert:

1. AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
2. Applichem, Darmstadt
3. Biochrom, Berlin
4. Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
5. Biozym Scientific GmbH, Wien, Österreich
6. Brüterei Thole, Bösel
7. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
8. CLN GmbH, Freising
9. Conrad Electronic, Hirschau
10. Hilgenberg, Malsfeld
11. Lonza, Basel, Schweiz
12. New England Biolabs, Ipswich, USA
13. Preprotech, Hamburg
14. Promega GmbH, Mannheim
15. Qiagen GmbH, Hilden
16. R&D Systems, Minneapolis, USA
17. S.C. Johnson & Son, Wisconsin, USA
18. Sarstedt, Nümbrecht
19. Siepmann GmbH, Herdecke
20. Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
21. Solis Biodyne, Tartu, Estland

22. ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

23. VWR International GmbH, Darmstadt

B. Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Analysewaage	Mettler PJ400	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Brüter	BSS 200/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brüter	BSS 300/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brüter (Kippend)	HEKA-Favorit-Olymp Sonderanfertigung	HEKA-Brutgeräte, Rietberg
Brutschrank für die Zellkultur	Heraeus Hera Cell	Heraeus Instruments, München
Brutschrank für die Zellkultur	CB 160	Binder GmbH, Tuttlingen
Dampfsterilisator	Varioklav Typ 500E	Thermo Scientific, München
Dremel®	DREMEL® 3000-15 Multifunktionswerkzeug	Conrad Electronic, Hirschau
Durchflusszytometer	FACS CantoII	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroporator	ECM 830 Square Wave Electroporation System	BTX, Holliston, USA
Elektroporator	Amaxa® Nucleofector® II Device	Lonza, Basel, Schweiz
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Gelkammer	Sub Cell GT	BioRad, München
Gel Dokumentation Software: Image Quant Capture 300	Image Quant 300	GE Healthcare, Garching
Horizontalschüttler	KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Mikroskop	Axiovert 25 Zeiss 25 HBO	Zeiss, Jena
Mikroskop	Leitz Wetzlar 5205 73	Leitz, Wetzlar
Mikroskop	Leica DMIL Kamera DF340XF	Leica, Bensheim
Mikroskop	Leica M165 FC Stereomikroskop	Leica, Bensheim
Mikrowelle	MS1987U	LG Electronics, Ratingen
Mikrowelle	Severin 7809	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern
Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrozentrifuge	Spectrafuge™ 24D Digital	Labnet International, Inc., Edison, USA
PCR-Workstation	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab, Erlangen

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
pH-Meter	Sartorius PB-11 mit Glaselektrode PY-P10	Sartorius AG, Göttingen
Power Supply	Power Pac 300	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	HeraSafe	Heraeus Instruments, München
Sicherheitswerkbank	BDK-SK 1200	Weiss Pharmatechnik GmbH Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank	Locator 6 Plus	Barnstead Thermolyne, Dubuque, USA
Thermocycler	MJ Mini	BioRad, München
Thermocycler	T100 TM Thermal Cycler	BioRad, München
Thermoblock	Biometra TB2	Biometra GmbH, Göttingen
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra GmbH, Göttingen
Tischinkubator	Flächenbrüter Modell 400	Siepmann GmbH, Herdecke
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter, Krefeld
Vortex-Mixer	GVLab®	Gilson Inc., Middleton, USA
Waage	Mettler PJ400	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Wärmeschränk	neoLab Universal Wärmeschränk Basic 391	neoLab Migge Laborbedarfs-GmbH
Wasserbad	GFL1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserbad	Memmert W350	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf, Köln
Zentrifuge	Sigma 2-6 Kleincentrifuge	Sigma, Deisenhofen

11. DANKSAGUNG

Mein Dank geht an Prof. Bernd Kaspers und Prof. Benjamin Schusser, die mir ihr Vertrauen geschenkt haben, indem sie mir dieses spannende Projekt überantwortet haben. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung und die Unterstützung bei kleinen und großen Problemen.

Vielen Dank an Prof. Thomas Göbel und Prof. Benjamin Schusser für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Großer Dank gebührt auch all meinen Kolleginnen und Kollegen, mit denen ich während der aufregenden Zeit meiner Doktorarbeit zusammenarbeiten durfte. Vielen Dank vor allem an Kate Sutton, Maria Laparidou, Kamila Lengyel und Nina Burkhardt für die tatkräftige Mitarbeit bei der Arbeit mit Embryonen und dem Kükenschlupf. Ohne euch wäre das nicht möglich gewesen. An Kate geht auch ein besonderer Dank für die Hilfe bei allen englischsprachigen Texten. Vielen Dank an Larissa Postrak, Sarah Lettmann und Bernhard Mutze, besonders für die Hilfe bei den Hühnern. Außerdem an Anke Staudt, vielen Dank für die vielen Minipreps sowie an Hicham Sid und Romina Hellmich, die erst später zur Gruppe stießen und sehr wertvoll für mich waren, als ich selbst nicht so mobil war.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Marina Kohn, für die tolle Einführung und Unterstützung bei der Arbeit mit primordialen Keimzellen und allem anderen, sowie an Theresa Thoma, auf deren unermüdliche Hilfe und aufbauende Worte ich immer zählen konnte.

Allen Kollegen ist es auch zu verdanken, dass ich viele schöne, unterhaltsame Stunden erst am Institut für Tierphysiologie der LMU und später am Institut für Biotechnologie der Reproduktion der TU verbringen durfte.

Die Betreuung der Hühner erfolgte gewissenhaft durch Fritz Meggendorfer, Andreas Schöffmann, Daniela Hölle, Thomas Hoschka und Tobias Kneuer. Vielen Dank für eure stete Hilfsbereitschaft!

Vielen Dank auch Anna Lounkova und der Arbeitsgruppe von Jiri Hejnar, Prag, für die freundliche Aufnahme und nette Zusammenarbeit.

Besonders dankbar bin ich meiner Familie, die immer zu mir hält und auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit. David, vielen Dank für deine Geduld. Rosi, danke für die wertvolle Hilfe bei so einigen Word-Problemen. Herzlichen Dank auch an meine Schwiegereltern, für Fachgespräche, Verpflegung und Unterkunft.